

Experimenteller Nachweis ultraschwacher Photonenemission aus biologischen Systemen

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereichs Physik
der Philipps-Universität Marburg/Lahn**

**vorgelegt von
Bernhard Ruth
aus Winterscheid**

Marburg/Lahn 1977

Experimenteller Nachweis ultraschwacher Photonenemission aus biologischen Systemen

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereichs Physik
der Philipps-Universität Marburg/Lahn**

**vorgelegt von
Bernhard Ruth
aus Winterscheid**

Marburg/Lahn 1977



Vom Fachbereich Physik der Philipps-Universität
Marburg (Lahn) als

Dissertation angenommen am: 6.6.77

Tag der mündlichen Prüfung: 7.7.77

Referenten: Doz.Dr. F.A.Popp

Prof.Dr.W.Fuhs

Zusammenfassung

Die Wachstumssteuerung in einem Organismus ist ein zentrales Problem in der Biologie. Experimente über "mitogenetische Strahlung" (Gurwitsch u.a.) und theoretische Überlegungen von Popp bringen diese Frage mit einer spontanen sehr schwachen Photonenemission aus biologischen Objekten in Verbindung. Deshalb gewinnen Untersuchungen der "ultraschwachen Photonenemission" mit einer Intensität bis zu $10 \text{ Photonen/s} \cdot \text{cm}^2$ an Bedeutung.

Zum Nachweis und zur Klärung einfacher Eigenschaften dient ein Photonen-zähler mit einem Photomultiplier vom Typ EMI 9558 QB. Ein Chopper vor dem Photomultiplier ermöglicht das Registrieren von Dunkel- und Hellzählrate, die in zwei Zählern getrennt summiert werden und deren Differenz ein Maß für die Photonenemission der Meßprobe ist. Die Meßprobe in einer Quarzküvette steht in einem von innen verspiegelten Ellipsoid, das die Strahlung auf die Photomultiplier-Kathode fokussieren soll. Zwischen Chopper und Ellipsoid können Filter zum Ausmessen des Spektrums eingeschoben werden.

Die Einstellung von Temperatur und Spannung am Photomultiplier und der Diskriminatorschwelle optimiert das Signal-Rausch-Verhältnis der Anlage. Die Eichung der Apparatur erfolgt bei Intensitäten in der Größenordnung der ultraschwachen Photonenemission und ergibt eine Quantenausbeute, wie sie für die Kathode angegeben ist.

Messungen an Hefezellen, Tradescantia-, Kartoffel- und Gurkenkeimen bestätigen die Existenz der Strahlung. Die Gesamtemission aus einem Gurkenkeim liegt bei 6000 Phot./s . Das Spektrum bei Gurkenkeimen weist ein Maximum bei 550 nm und einen Wiederanstieg im langwelligen Bereich auf.

Die Zugabe von verschiedenen Chemikalien kann die Intensität der Strahlung bis zu einem Faktor um 100 erhöhen, das Spektrum aber ungeändert lassen. Kochsalz-Lösung dagegen verformt auch das Spektrum. Tumorzellen strahlen nur sehr wenig, erhöhen aber ihre Intensität weit überproportional

nach Zugabe von 4HPCP. Häufig sind Schwankungen der Gesamtaktivität zu beobachten, die in Einzelfällen bis zu 30 % betragen können.

Es wird durch die Experimente nahegelegt, daß die Photonenemission mit wichtigen biologischen Vorgängen in der Zelle und im Zellverband zusammenhängt.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Die mitogenetische Strahlung	1
1.2.	Wachstumssteuerung über chemische Prozesse	4
1.3.	Bedeutung des Lichtes in der Biologie	6
1.4.	Ultraschwache Photonenemission	6
2.	Aufbau und Test der Apparatur	12
2.1.	Photonenzähler	13
2.2.	Konstruktion vom mechanischen Teil der Meß- apparatur	15
2.3.	Der elektronische Teil	27
2.4.	Test der Apparatur	30
3.	Einstellung und Eichung	33
3.1.	Abhängigkeit der Zählraten von Spannung, Temperatur und Diskriminatorschwelle	33
3.2.	Versuchsaufbau zur Optimierung und Eichung	36
3.3.	Optimierung des SNR	38
3.4.	Eichung	41
3.5.	Kontrollmessungen	45
3.6.	Ausmessen des Raumwinkels	46
3.7.	Auswerteformel und Fehler	48
4.	Experimente und Meßergebnisse	52
4.1.	Hefezellen	52
4.2.	Tradescantia- und Kartoffelkeime	54
4.3.	Gurkenkeime	55
4.4.	Gurkenkeime nach Zusatz von Chemikalien	57
4.5.	Tumorzellen	62
5.	Diskussion	65
5.1.	Die ultraschwache Photonenemission als biologische Erscheinung	65
5.2.	Einfluß des biologischen Gewebes	70
5.3.	Weitere Konsequenzen der Strahlung für die Biologie	75
6.	Zusammenfassung der Ergebnisse und Folgerungen	78
	Referenzen	79

1. Einleitung

Wachstumssteuerung in einem Organismus und die Steuerung der Funktionen in einer Zelle sind zentrale Probleme der Biologie. Zur Aufklärung dienen u.a. Untersuchungen über die gegenseitige Beeinflussung von biologischen Objekten. Theoretische Vorüberlegungen deuten auf eine Beteiligung von Strahlen bei der Wachstumssteuerung hin (St 32).

1.1. Die mitogenetische Strahlung

1923 veröffentlichte Gurwitsch seinen Grundversuch mit Zwiebelwurzeln. Er brachte die Spitze einer Zwiebelwurzel (Induktor) sehr nahe an den Schaft einer zweiten Zwiebelwurzel (Detektor), ohne daß sich beide berührten. In der Detektorwurzel konnte er an der Stelle, die der Induktorwurzel gegenüberlag, eine erhöhte Mitosenzahl im Vergleich zu anderen Stellen derselben Wurzel feststellen. Experimente mit Glas- und Quarzglasplatten zwischen den Wurzeln zeigten, daß UV-Strahlung die Wachstumsanregung überträgt. Weil diese Strahlung scheinbar Mitosen erzeugt, nannte sie Gurwitsch deshalb "mitogenetische" (mitoseerzeugende) Strahlung (St 32). Allerdings wurden diese Experimente nicht allgemein anerkannt, weil die Erhöhung der Mitosenzahl nicht wesentlich über ihre natürlichen Schwankungen herausragte. Außerdem ließen sich die Experimente nicht sicher reproduzieren. Zudem war die Frage ungeklärt, welche anderen Einflüsse noch auf die Mitosenzahl einwirken (Kr 34). Z.B. kann schon eine bloße Berührung der Wurzel eine Erhöhung der Mitosenzahl nach sich ziehen (Sch 30). Um die Zweifel auszuräumen, führten Gurwitsch und seine Mitarbeiter umfangreiche biologische Untersuchungen durch. Als Detektor dienten nun Hefezellen auf Agar-Nährböden: Eine bestimmte Fläche der Kultur wurde mitogenetischer Strahlung ausgesetzt. Die erhöhte Mitosehäufigkeit der Zellen in dieser Fläche im Vergleich zu der in

einer unbestrahlten Fläche zeigte dann den mitogenetischen Effekt an.

Nach diesen Experimenten ist die Erhöhung der Mitosezahl auf eine Beschleunigung des Teilungsrhythmus zurückzuführen (Gu 59). Als mitogenetische Strahlungsquellen kommen nicht nur alle möglichen biologischen Objekte in Betracht, sondern auch spezielle organische und anorganische Reaktionen und abgeschwächtes künstliches Licht (St 32, Ch 30). Dabei taucht natürlich die Frage auf, ob immer derselbe Effekt untersucht wird, weil z.B. auch schwache Radium- oder Röntgenstrahlung die Mitose anregen (Sch 30, St 32).

In biologischen Objekten soll die Strahlung durch Rekombination von Radikalen entstehen, die in oxidativen, proteolytischen und glykolytischen Prozessen vorkommt (St 32, Gu 59, Lo 74). Dies erklärt die hohe Energie und geringe Intensität der Strahlung.

Die Erhöhung der Mitosezahl in Hefezellkulturen beschränkt sich nicht auf die unmittelbar bestrahlte Fläche, sondern geht bis zu 3 mm über den Rand hinaus. Das wird durch die sogenannte Sekundärstrahlung gedeutet, die auch mitogenetische Eigenschaften hat und die von den durch Primärstrahlung getroffenen Zellen ausgeht. Die Sekundärstrahlung macht auch die Wirkung in tieferen Gewebeschichten trotz starker Absorption von UV-Strahlung verständlich (St 32, Gu 59). Die Zeitverzögerung zwischen Primär- und Sekundärstrahlung beträgt etwa 1 ms und die Geschwindigkeit der Sekundärstrahlung ist annähernd 20 m/s (St 32).

Nach rascher Abkühlung, Zentrifugieren oder Zugabe von Giften entsteht in Zellen eine besonders starke Strahlung, die Degradationsstrahlung. Sie wird durch die irreversible Zerstörung eines molekularen Ordnungszustandes erklärt.

Die Transmission durch Quarzglas und auch die Reflexion an einer Hg-Oberfläche beweisen den Strahlungscharakter des mitogenetischen Effektes (Ra 31, St 32, Gu 59).

Verschiedenen Autoren gelingt auch der Nachweis der mitogenetischen Strahlung mit physikalischen Methoden. Dazu

wird der lichtelektrische Effekt an Metalloberflächen benutzt, die entweder in Zählrohre oder in Spitzenzähler eingebaut sind. Die ermittelten Intensitäten liegen zwischen 10 und 10^4 Photonen/s.cm². Die Wellenlänge der Strahlung hat einen Wert zwischen 200 und 260 nm, wie Experimente mit verschiedenen Glas- und Quarzglasplatten (Ra 31, Gr 37) und der Vergleich des lichtelektrischen Effektes an verschiedenen Metalloberflächen zeigen (Au 38).

Andere Autoren dagegen stellen mit Apparaturen ähnlicher Empfindlichkeit keine Strahlung fest (Sch 30, Se 32, Kr 34, St 35, Ho 37), so daß man nicht von einem gesicherten physikalischen Nachweis sprechen kann. Verschiedentlich erwähnen die Verfasser auch die schlechte Reproduzierbarkeit explizit, deren Ursache sie in den biologischen Objekten selbst vermuten (St 35, Ko 65). Den Autoren, die Strahlung aus biologischen Systemen nachweisen, wird vorgeworfen, nur unzureichende Statistiken vorgelegt zu haben (Kr 34). Vielfach ist die Quantenausbeute und damit die Leistungsfähigkeit der Apparaturen weit überschätzt worden - bis zu zwei Zehnerpotenzen (Kr 34) - ebenso wie die Möglichkeit, eine bestimmte Lichtintensität über mehrere Zehnerpotenzen definiert abzuschwächen (Ra 31, Sch 30).

In Tabelle 1 sind die Autoren aufgeführt, die sich um einen Nachweis der mitogenetischen Strahlung mit physikalischen Methoden bemüht haben.

Andere Eigenschaften der mitogenetischen Strahlung rufen ebenfalls Skepsis hervor: So kann eine größere Distanz zwischen Induktor und Detektor nicht durch eine längere Bestrahlungsdauer kompensiert werden (Kr 34). Dagegen erhöht eine zeitliche Fraktionierung der Strahlung den Effekt beträchtlich und ermöglicht nun sogar eine erhebliche Vergrößerung des Abstandes (St 32).

Zusammenfassend ist festzustellen: Mit der Untersuchung der mitogenetischen Strahlung wurde ein zentrales Problem der Biologie angepackt. Doch reichten die technischen Möglichkeiten der damaligen Zeit nicht aus, um auch nur die Existenz der Strahlung unwiderruflich zu

belegen, so daß die Zweifel schließlich überwogen. Nach 1940 erschienen nur noch wenige Originalarbeiten über die mitogenetische Strahlung, z.B. Be 57 und Ko 65.

1.2. Wachstumssteuerung über chemische Prozesse

In der folgenden Zeit wurde die Wachstumssteuerung auf chemische Mechanismen zurückgeführt. Hauptsächlich in "Wundversuchen" glaubte man beim Verheilen der Wunden den Stoffen auf die Spur zu kommen, die das Wachstum regulieren. In einer Wundhormontheorie vertritt Haberlandt ab 1913 den Standpunkt, daß verletzte Zellen ein Hormon freisetzen oder produzieren, das andere Zellen zur Teilung anregt (Sch 30). Der Mechanismus, der das Ende des Wachstums festlegt, bleibt aber ungeklärt; außerdem gelingt es nicht, dieses Hormon zu isolieren (Sü 70).

Den Experimenten von Bullough (1958) zufolge, synthetisieren die Zellen eines Gewebes einen Hemmstoff, der bei genügender Konzentration die Zellteilung in dem betreffenden Gewebe unterbindet. Entsteht eine Wunde oder wird ein Teil des Gewebes entfernt, so sinkt die Konzentration, und die Zellen können sich teilen, bis die ursprüngliche Konzentration wiederhergestellt ist (Bu 60, Bu 61). Diese Substanz läßt sich isolieren und erhält die Bezeichnung Chalon. Es ist aber noch keine Reindarstellung gelungen. Die Wirksubstanzen in verschiedenen Geweben können unterschiedlichen Klassen von Biomolekülen angehören, z.B. den Glykoproteinen (in der Haut) oder anderen Proteinkomplexen. Ihre Molekulargewichte variieren stark und reichen bis zu Werten von 25000. Moleküle dieser Größe diffundieren aber kaum frei durch eine Membran. Für die Chalontheorie ist das allerdings eine wesentliche Voraussetzung (Er 75). Möglicherweise lagert sich ein Chalon-Molekül auch nur außen an die Membran an und bewirkt von dort aus eine Teilungshemmung.

Die wichtige Funktion der Membran bei der Zellsteuerung wird vor allem durch die Kontaktinhibition gezeigt.

Zellen, die in Monolayern wachsen, wandern aktiv über eine Fläche, stellen aber sofort ihre Bewegung ein, wenn sie eine andere Zelle berühren. Der Zellkontakt hat einen tiefgreifenden Einfluß in die Zellfunktion, so wird z.B. die Teilungsrate drastisch gesenkt (Ru 74). Andererseits hängt die Teilungsrate auch von anderen Faktoren ab, wie z.B. dem Zustand des Nährmediums (Sü 70).

Die Untersuchungen der Wundheilungen liefern viele wertvolle Ergebnisse über Wachstumssteuerung. Trotzdem sind manche Forscher der Meinung, daß auf diese Weise keine Lösung der fundamentalen Probleme erreicht werden kann. So schreibt z.B. Szent-Györgyi schon 1941: "My own biochemical research of two decades has yielded one or another insignificant result - the isolation of this or that - but whenever I was faced with a fundamental problem, I failed." (Sz 41).

Möglicherweise eignen sich biochemische Untersuchungsmethoden nicht zur Klärung der fundamentalen Probleme im Zusammenhang mit der Wachstumssteuerung, weil dabei die räumlichen Strukturen des Zellverbandes nicht erhalten bleiben.

Es gibt auch prinzipielle Einwände aus der Thermodynamik: Der morphologische Aufbau eines Organismus kann unmöglich allein durch chemische Effekte hervorgerufen werden. Es sind auch gerichtete Größen notwendig (St 32). Das belegt auch das Theorem von Curie, nach dem eine skalare Reaktion in einem isotropen Medium keinen vektoriellen Effekt zur Folge haben kann (Ha 63, Bi 73).

Durch die Anwesenheit von Membranen ist eine Anisotropie gegeben, so daß Stofftransporte durch Membranen nicht im Widerspruch zu dem Theorem stehen (Bi 73, Sch 75). Das ist aber keine endgültige Lösung des Problems, denn die Membranen werden ebenfalls durch biochemische Reaktionen hergestellt, zu denen auch schon Stofftransporte notwendig sind. Die Fragen zur Steuerung von Stofftransporten, zum morphologischen Aufbau u.s.w. sind demnach erst dann geklärt, wenn auch für die Entstehung und den Ort der Membran ein Regelmechanismus gefunden worden ist.

1.3. Bedeutung des Lichtes in der Biologie

Zwischen Licht und Organismen bestehen vielfältige Wechselwirkungen. Die folgenden drei Beispiele zeigen die Bedeutung der Lichtabsorption für biologische Objekte.

1. Durch Photosynthese - wohl dem bekanntesten Effekt - werden in Pflanzen energiereiche Verbindungen, wie ATP und Moleküle der Form $(\text{CH}_2\text{O})_n$ hergestellt.
2. Die Photoreaktivierung ist ein Prozeß, der durch UV-Bestrahlung verursachte Schäden an der DNS schnell und sicher behebt. Dafür benötigen die Zellen ein spezielles Enzym und zusätzliches UV-Licht (Ke 69).
3. Die Zugabe von Riboflavin zu dem Nährmedium von Pflanzen hat bei Dunkelheit eine Wachstumsförderung zur Folge, bei Lichteinstrahlung dagegen eine Wachstumshemmung (Ga 50).

Bei der Biolumineszenz emittieren die Organismen Licht. Diese Erscheinung tritt bei Bakterien, Pilzen, Insekten und Fischen häufig auf. Sie wird aber nicht bei höheren Pflanzen und Tieren beobachtet (Co 11). Die Intensitäten liegen zwischen 10^{11} eV/s und 10^{18} eV/s, die Wellenlängen zwischen 415 nm und 720 nm mit einem Maximum bei 550 nm (Co 11). Das Licht entsteht durch eine spezielle Enzym-Substrat-Reaktion (Luciferase, Luciferin). Es gibt aber keinen einheitlichen biochemischen Reaktionsablauf bei den verschiedenen Organismen.

Eine ganze Reihe von organischen und anorganischen Reaktionen liefern auch bei Zimmertemperatur Licht (Gu 59, Au 38, St 62, Hö 65). Die Rolle dieser Chemilumineszenzreaktionen in der Biologie ist ungeklärt.

1.4. Ultraschwache Photonenemission

Im folgenden wird nur die Lichtemission aus biologischen Systemen betrachtet, die nicht in speziellen Organen entsteht und vermutlich nicht auf Enzym-Substrat-Reaktionen

zurückgeht. Es ist damit keine Biolumineszenz. Die Systeme sollen vorher nicht durch Photonenabsorption, chemische Agenzien, Elektrolyse oder mechanische Zerstörung angeregt werden, sondern im "natürlichen Zustand" bleiben. Diesen Begriff "natürlicher Zustand" kann man nicht scharf abgrenzen, denn wie ordnet man z.B. die Änderung eines Zell-Nährmediums oder einen künstlich gereizten Muskel ein. Eine derartige Lichtemission aus biologischen Systemen soll wegen ihrer geringen Intensität "ultraschwache Photonenemission" (PE) genannt werden. In der Tabelle 1 sind bisherige Untersuchungen der PE und einige ihrer Eigenschaften, wie Vorkommen, Intensität und Wellenlänge, chronologisch aufgestellt.

Diese Forschungen sollen den funktionellen Status von biologischen Systemen anhand von Nichtgleichgewichts-Zuständen untersuchen (Ko 65). Bei den Messungen wurden nun Photomultiplier als Photonenzähler benutzt. Die wesentlich höhere Quantenausbeute und das geringere Eigenrauschen setzte die Nachweisgrenze beträchtlich herab.

Colli et al. weisen eine PE bei Pflanzenkeimen (Weizen, Linsen und Korn) der Größenordnung 100 - 1000 cps (counts per second) nach. Sie stellen unterschiedliche Gesamtkaktivitäten je nach Sorte fest, sowie ein Absinken der Intensität mit der Zeit (Co 54). Die Strahlung geht hauptsächlich von den Wurzeln aus (Co 55), aber auch von den Stämmen der Keimlinge (Ag 65a). Das vorherige Waschen mit keimtötenden Lösungen stellt sicher, daß die PE nicht von Mikroorganismen verursacht wird (Co 54, Ag 65b).

Hefezellen strahlen mit einer wesentlich geringeren Intensität, nämlich mit ca. 0,5 cps (Ko 66).

Auch tierische Zellen wie elektrisch erregte Froschnerven und -muskeln sowie Mäuseleber emittieren eine Strahlung (Ar 67, Bl 68, Sh 72).

Systematische Untersuchungen an über 90 Arten ergeben Intensitäten zwischen 0 und 2000 Photonen/s·cm². Dabei ist ein Ansteigen der Intensität mit zunehmendem entwicklungsgeschichtlichen Stand der Art zu erkennen (Ma 69).

Das Spektrum der PE von Pflanzenkeimen weist ein Maximum

Tab. 1 Physikalische Messungen der mitogenetischen Strahlung

Jahr	Nachweismethode Apparatur	Dunkel- zählr. cps	Empfindlichk./ counts ($\frac{\lambda}{\text{nm}}$) Photon	Nachweisgrenze/ Photonen s. cm ²
1930	Zählrohr, Ka	0,1	$1,4 \cdot 10^{-4}$ (266)	1800
1931	Zählrohr, Cd	0,3-0,6	10^{-3} (265)	12
1931	Zählrohr, Al	-	$5 \cdot 10^{-4}$ (254)	-
1932	Lichtelektr.Eff.	-	-	-
1934	Zählrohr, Zn	0,5	$4 \cdot 10^{-5}$ (254)	-
1935	Spitzenzähler, Cd	0,2	$1,4 \cdot 10^{-4}$ (254)	13
1935	Lichtelektr.Eff.	-	-	-
1935	Lichtelektr.Eff.	-	-	-
1937	Spitzenzähler, Cd	0,5	10^{-2} (265)	-
1937	Lichtelektr.Eff.	-	-	-
1937	Lichtelektr.Eff.	-	-	-
1938	Zählrohr, Al	0,5-1,0	10^{-5} (236)	12 - 1200
1954	PM, EMI6260 RCA5819	20	0,17	-
1955	PM, EMI6260 RCA5819	130	-	-
1957	Zählrohr, Au	0,2-0,3	-	10
1963	PM, FEU 18	0,7-0,8	-	-
1964	PM, Analogsign.	-	-	10^7
1965	PM, FEU 42	25-30	-	-
1965	PM, FEU 42	23	-	-
1966	PM, FEU 18A	0,4-0,8	$2 \cdot 10^{-3}$	-
1967	PM, FEU R3	0,4-1,0	-	-
1968	PM	1	-	100
1968	PM, FEU 42	4,5	-	-
1969	PM, FEU 42B	-	-	-
1969	PM	-	$6 \cdot 10^{-3}$	-
1972	PM, FEU 18A	0,3-0,6	$8,5 \cdot 10^{-3}$ (250)	-

und ultraschwachen Photonenemission

Biologisches Objekt	Intensität/ Photonen $s \cdot cm^2$	Wellenl. nm	Signif. Nach- weis	Zitat	Bem.
Hefe	< 120	-	Kein N.	Sch30	-
Zwiebelwurzeln Karzinombrei	13-130	UV	99,9	Ra31	-
Froschmuskel Froschherz	$\approx 600-2000$ 400	220	-	Fr31	Zit.St32
Allium cepa	< 10	230-340	Kein N.	Se32	Zit.Sch39
Hefe	< 300	-	Kein N.	Kr34	-
Zwiebelwurzeln Blut	-	-	Kein N.	St35	-
Nerven (gereizt)	10^3-10^4	230-240	-	Au35	Zit.Sch39
Discoglossus-Eier	10^2-10^3	200-250	-	Le35	Zit.Sch39
Helianthuswurzeln Keime von Helianth., Erbsen, Bohnen, ...	3-10	240-270	99,9	Gr37	Filter
Bakterien	< 500	≈ 230	Kein N.	Ho37	Zit.Sch39
Tumoren	10-100	190-230	-	Od37	Zit.Sch39
Froschnerven Froscheier	10^3-10^4 10^2-10^3	230-240 200-250	99,9	Au38	-
Weizenkeime Linsenkeime Kornkeime	55 cps 110 cps 170 cps	450-650	-	Co54a	-
Weizenkeime Linsenkeime Bohnenkeime	680 cps 370 cps 630 cps	390-600	-	Co55	Filter
Fibroblastenkultur	0,05cps	195-210	99,9	Be57	-
Gerstenwurzeln	1,5-2,5cps	500	-	Ve63	Filter
Hefe	-	-	Kein N.	St64	-
Weizenkeime	60 cps	-	-	Ag65a	-
Getreidekeime	15-20cps	-	-	Ag65b	-
Hefe	0,5 cps	250-380	99,9	Ko66	Filter
Froschnerven	3-5 cps	-	99,9	Ar67	-
Tierzellen	-	-	Kein N.	Hb68	-
Froschmuskeln	1 cps	rot	-	Bl68	-
Maiskeime	10-20cps	-	-	Do69	-
über 90 Arten	0 - 2000	370-650	> 95	Ma69	-
Mäuseleber	0,1-0,2cps	-	99,9	Sh72	-

bei 550 nm auf (Co 55, Ve 63). Nach Untersuchungen von Konev dagegen liegt das Emissionsmaximum bei Hefezellen in der Nähe von 330 nm (Ko 66), und Blokha stellt bei Froschmuskeln eine Strahlung im roten Bereich fest (Bl 68).

Die Temperaturabhängigkeit der PE von Pflanzenkeimen ist in Abb. 1 dargestellt. Stämme und Wurzeln haben die gleiche Abhängigkeit (Ve 63, Ag 65a). Nach Untersuchungen mit

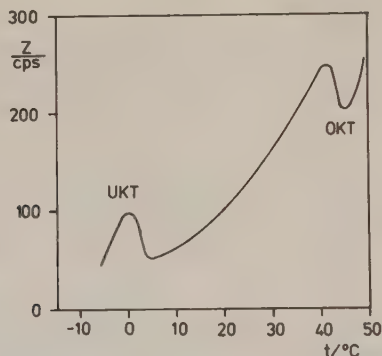


Abb. 1 Skizze der Temperaturabhängigkeit der ultra-schwachen Photonenemission nach Ve 63 und Ag 65b
 UKT - Untere kritische Temperatur
 OKT - Obere " "

verschiedenen Getreidezüchtungen steigt der obere kritische Temperaturpunkt mit zunehmender Hitzeresistenz der Züchtung (Ag 65a, b, Do 69). Entsprechend sinkt der untere Temperaturpunkt mit höherer Frostresistenz.

Überschreitet die Temperatur einen der Grenzwerte, so wird der Keim irreversibel zerstört und zeigt eine monoton ansteigende Temperaturabhängigkeit der Intensität, wie sie bei toten Keimen zu sehen ist (Ag 65b).

Die PE kann jederzeit durch Entzug von Sauerstoff gestoppt werden (Ve 63, Ya 69). Bei genaueren Messungen steigt die Intensität der PE linear mit dem Sauerstoffanteil des umgebenden Gases an und geht dann in Sättigung über. Der

Übergangspunkt liegt recht genau bei 20 % Sauerstoffkonzentration, dem Sauerstoffanteil in der Atmosphäre (Ve 63). Auch eine Druckerhöhung vergrößert die PE nicht. Das ist ein Verhalten, wie es von einer normalen Chemilumineszenz nicht erwartet wird (Ag 73). Beim Durchleiten von Sauerstoff durch eine Hefezellensuspension erhöht sich ebenfalls die PE (St 64).

Als Ursache der PE vermutet man eine nicht enzymatische Oxidation von Lipiden (Po 63, Ba 69). Allerdings kann das nur als eine mögliche Reaktion angesehen werden, denn es sind auch Photonenemissionen bei reinen Enzym-Substrat-Reaktionen beobachtet worden. Verschiedene Autoren haben eine PE bei isolierten Mitochondrien registriert und verknüpfen sie mit der oxidativen Phosphorylierung (Vl 64, St 66, Zh 73).

Die Strahlungsintensität eines Keimes hängt von dem Keimalter ab und hat ein Maximum zwischen dem 4. und 7. Tag (Co 55). An synchronisierten Hefezellkulturen konnte Konev zeigen, daß die PE etwa 1 - 2 Stunden vor der Mitose auftritt (Ko 66).

Da die Temperaturabhängigkeit der PE bei verschiedenen Züchtungen der gleichen Sorte unterschiedlich ist, muß ein Einfluß des genetischen Codes vorliegen.

Alle diese Punkte zeigen eine enge Verknüpfung der PE mit wichtigen biologischen Prozessen.

In den letzten Jahren sind nun wieder Veröffentlichungen, oder besser Kurzmitteilungen, bekannt geworden, die direkt den Informationsaustausch zwischen Zellen durch Photonenemission nahelegen (Ka 73a, b).

Theoretische Untersuchungen deuten auch auf eine Verknüpfung zwischen Wachstumssteuerung und Photonen Austausch hin (Pu 55, Po 72a - c, Po 74, Po 75, Po 76, Po 77a).

Eine Meßapparatur, die zur Untersuchung der besprochenen Phänomene notwendig ist, muß im Bereich zwischen 200 nm und 700 nm empfindlich sein und Intensitäten von 10 Photonen/s cm^2 und weniger nachweisen können.

2. Aufbau und Test der Apparatur

Um Lichtintensitäten der Größenordnung von $10 \text{ Photonen/s} \cdot \text{cm}^2$ nachzuweisen, stehen zwei Möglichkeiten zur Verfügung: Bei Halbleitern wird die Photoleitung und bei Photomultipliern die Photoemission ausgenutzt. Im sichtbaren und ultravioletten Bereich kann der Photomultiplier gegenüber dem Halbleiter um eine Zehnerpotenz geringere Intensitäten nachweisen (Mo 68, Ke 72). Für dieses Problem ist also der Photomultiplier (PM) der angemessene Detektor. Zur Festlegung der Nomenklatur sei kurz die Arbeitsweise eines PM erklärt. Ein Photon löst nach Absorption in der halbdurchlässigen Schicht der PM-Kathode die Emission eines Elektrons aus. Die Wahrscheinlichkeit der Emission, die Quantenausbeute q der Kathode, hängt vom Kathodenmaterial und der Wellenlänge des einfallenden Lichtes ab. Das Elektron wird durch eine Spannung beschleunigt und auf die erste Dynode gelenkt. Die Dynoden sind mit einer Substanz beschichtet, die nach Auftreffen eines Elektrons mehrere Sekundärelektronen emittiert. Der Vervielfachungsfaktor hängt wesentlich von der angelegten Spannung ab und liegt zwischen 2,5 und 4. Durch das Hintereinanderschalten von mehreren (n) Dynoden steigert sich die Elektronenzahl lawinenartig, bis schließlich zwischen 10^6 und 10^7 Elektronen auf die Anode treffen (Stromverstärkung V), von der dann ein Impuls abgeleitet werden kann. Eine Spannungsteilerschaltung hält die unterschiedlichen Potentiale von Kathode und Dynoden aufrecht. Ein idealer PM produziert demnach für jedes von der Kathode emittierte Elektron einen Impuls einheitlicher Höhe und Breite. In Wirklichkeit dagegen variiert die Impulsform beträchtlich und der PM erzeugt zusätzlich noch Impulse unterschiedlicher Höhe und Häufigkeit als Folge von spontanen Emissionen, Widerstandsrauschen, Leckströmen und anderen Störungen. Diese zusätzlichen Impulse entstehen selbstverständlich auch dann, wenn kein Licht auf die Photokathode fällt. Die Impulshöhenverteilung, die die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Impulses über einer

bestimmten Höhe angibt, fällt rein exponentiell mit zunehmender Impulshöhe ab (Ro 63, Ma 68, Mo 68, Fo 69). Einige Autoren dagegen finden Abweichungen von diesem Verlauf, die einer Rechteck-Funktion für den idealen PM näherkommen (Co 54b, Ol 68, Co 71, Bi 73).

2.1. Photonen-zähler

Die einfachste Möglichkeit, die Ausgangsimpulse zu registrieren, ist die Gleichstrommessung nach einer Verstärkung. Eine Verbesserung für den Nachweis geringer Lichtintensitäten bietet die Lock-in-Methode.

In einem aufwendigeren Verfahren werden die einzelnen Impulse gezählt (Pulse Counting: PC). Die Abb. 2 veranschaulicht die Arbeitsweise (Za 72).

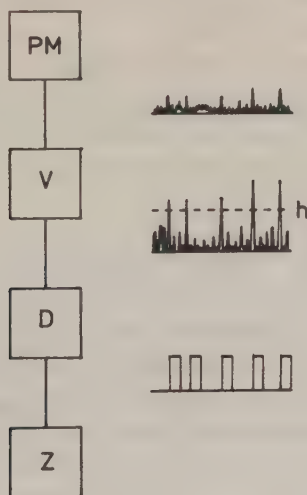


Abb. 2 Prinzipschaltung eines Photonen-zählers

PM - Photomultiplier

V - Verstärker

D - Diskriminator

Z - Zähler

h - Diskriminatorschwelle

Die Impulse des PM gelangen nach einer Verstärkung in einen Diskriminator, der immer dann einen logischen Im-

puls abgibt, wenn der Eingangsimpuls eine bestimmte einstellbare Diskriminatorschwelle h überschreitet. Diese logischen Impulse registriert ein Zähler.

Mit diesem Verfahren läßt sich die Nachweisgrenze beträchtlich senken, denn Elektronen, die von der Kathode nach Absorption eines Photons oder spontan emittiert werden, haben überwiegend große Impulse zur Folge. Die Störungen dagegen, wie Leckströme, Widerstandsrauschen oder spontane Emissionen der Dynoden verursachen überwiegend kleine Impulse. Diese aber treten entsprechend der exponentiellen Impulshöhenverteilung am häufigsten auf, so daß im Anschluß an die Diskriminierung der Untergrund verringert ist.

Vergleichende Untersuchungen der Nachweisgrenzen und Empfindlichkeit von PC- und Lock-in-Methode zeigen eindeutig die Überlegenheit des ersten Verfahrens (Al 68, Eb 67, Na 68, Fo 69). Lediglich ein Autor findet keinen signifikanten Unterschied (Ro 70).

Bei dem PC-Verfahren genügen auch geringere Ansprüche an die Konstanz der Versorgungsspannung des PM. Denn bei der Gleichstrommessung hängt der relative Fehler der Verstärkung empfindlich von der Spannungskonstanz nach

$$\frac{\Delta V}{V} \sim n \frac{\Delta U}{U}$$

ab, wobei n die Zahl der Dynoden ist (Va 74).

Einen zusätzlichen Vorteil bietet die digitale Datenausgabe, die eine leichtere Optimierung der Anlage, eine genaue Fehlerangabe und das Berechnen von Signifikanzniveaus für den Nachweis ermöglicht. Aus diesen Gründen wurde bei dem vorliegenden Problem das PC-Verfahren angewendet.

In Dunkelheit erzeugt der PM ebenfalls Impulse, die größer als die Diskriminatorschwelle sind. Die Häufigkeit wird durch die Dunkelzählrate (DZR) angegeben. Bei beleuchteter Kathode entstehen zusätzliche Impulse. Die Differenz von Hellzählrate (HZR) n_H und DZR n_D ist die Photonenzählrate S , die ein Maß für die einfallende

Lichtintensität und damit das Signal ist.

$$S = n_H - n_D \quad (1)$$

Das zugehörige Rauschen ΔS errechnet sich aus der Streuung der HZR Δn_H und der DZR Δn_D durch

$$\Delta S = \sqrt{\Delta n_H^2 + \Delta n_D^2}.$$

Für das Signal-Rausch-Verhältnis (SNR: Signal-noise-ratio) gilt dann folgender Ausdruck (Eb 67, Jo 71):

$$\frac{S}{\Delta S} = \frac{n_H - n_D}{\sqrt{\Delta n_H^2 + \Delta n_D^2}} \quad (2)$$

Die Definition des SNR entspricht auch der Größe $\hat{t}$ im Student-Test zur Berechnung von Signifikanzniveaus (siehe Sa 69, Sa 70).

Die Photonenzählrate S ist außerdem durch die Quantenausbeute q und den auf die PM-Kathode einfallenden Photonenstrom P bestimmt.

$$S = q \cdot P$$

Aus Gleichung (2) folgt damit

$$\frac{S}{\Delta S} = \frac{q \cdot P}{\sqrt{\Delta n_H^2 + \Delta n_D^2}} \quad (2')$$

Das SNR läßt sich daher durch folgende Maßnahmen vergrößern:

1. Verringern der Streuungen Δn_H und Δn_D ,
2. Vergrößern der Quantenausbeute q und
3. Vergrößern des wirksamen Raumwinkels, der bei einer gegebenen Strahlungsstärke der Probe den auf die PM-Kathode einfallenden Photonenstrom P erhöht.

2.2. Konstruktion vom mechanischen Teil der Meßapparatur

Diese Punkte bestimmen wesentlich den apparativen Aufbau, der im folgenden behandelt wird. Die Abhängigkeit des SNR von anderen Größen, wie PM-Spannung und Diskriminatoreinstellung, kommt im nächsten Kapitel zur Sprache.

Die Erniedrigung der Streuung von DZR und HZR durch Abkühlung des PM ist die wirkungsvollste Möglichkeit zur SNR-Verbesserung. Ein wesentlicher Teil der DZR geht auf thermische Emission von Elektronen aus Kathode und den ersten Dynoden zurück und ist demnach aus dem Richard-schen Gesetz abzuleiten (Ro 63, Al 68, Ol 68, Fo 69). Ein Abkühlen des PM reduziert die DZR je nach PM-Typ um einen Faktor zwischen 10 und 10^3 (Co 54b, Na 68). Bei weiterem Abkühlen bleibt die DZR praktisch konstant. Der Temperaturbereich, von dem an die DZR nicht mehr wesentlich von der Temperatur abhängt, variiert zwischen 0°C und -40°C je nach PM-Typ (Ro 63, Ga 65, Co 71).

Als Ursache für die nicht-thermale DZR wird u.a. die natürliche Radioaktivität angesehen (Mo 68, Ol 68, Fo 69). Auch die Ionisation von Gasmolekülen im PM, die dann auf Kathode und Dynoden treffen, erzeugt Impulse. Das Abkühlen hilft auch in diesem Fall, weil dann das Glas die Gasmoleküle adsorbieren kann (Al 68, Yo 69).

In dem PM selbst entstehen auch Photonen durch Rekombination von Gasionen, Auftreffen von Elektronen oder Ionen auf Glas mit anschließender Fluoreszenz und den Cerenkov-Effekt.

Bei Fluoreszenz im Glas können Photonen durch einen Lichtleitereffekt zur PM-Kathode gelangen (Ol 68).

Es treten im PM gelegentlich auch Riesenimpulse auf, die durch die gleichzeitige Emission von Elektronen oder Photonen erklärt werden (Al 68, Mo 68). Die restliche DZR läßt sich also schlecht unterbinden, so daß ein Abkühlen unter -40°C vermutlich keine SNR-Verbesserung zur Folge hat. Es ist auch zu bedenken, daß nicht die DZR selbst, sondern deren Streuung in das SNR eingeht. Die DZR hat eine größere Streuung als nach der Poisson-Statistik zu erwarten ist (Ga 65, Co 71); sie soll sogar mit sinkender Temperatur noch zunehmen (Ro 63, Na 68).

Zusätzlich besteht auch eine Abhängigkeit der Quantenausbeute von der Temperatur. Je nach Kathodentyp und betrachteter Wellenlänge kann sie ansteigen oder absinken (Co 71, Vo 74). Die multiplizierenden Eigenschaften sollen aller-

dings weitgehend unabhängig von der Temperatur sein (Co 54b).

Die optimale Temperatur für das SNR steht bei einem PM nicht von vornherein fest und kann nur durch eine direkte Messung des SNR bestimmt werden.

Eine Kühlkammer für den PM muß eine Temperatur von -40°C erreichen. Dafür ist ein Kryostat mit der Kühlflüssigkeit Methanol geeignet, weil er eine variable Temperatureinstellung bei hoher Temperaturkonstanz hat und beim langsamen Abkühlen einen thermischen Schock des PM vermeidet. Ein Quarzglasfenster vor dem PM verhindert ein Vereisen der PM-Kathode.

Das Fenster darf Licht bis zu einer Wellenlänge von 200 nm nicht nennenswert absorbieren. Damit das Fenster nicht beschlägt, muß es vom gekühlten PM thermisch isoliert werden. Ein Doppelfenster wäre ungeeignet, weil es den Abstand zwischen PM und Probe vergrößert und den wirksamen Raumwinkel zu stark einschränkt. Deshalb wird die Kühlkammer selbst evakuiert, so daß kein thermischer Kontakt zwischen Quarzscheibe und PM besteht. Dadurch läßt sich außerdem noch die erreichbare Kühltemperatur erniedrigen. Der PM-Sockel mit dem Netzwerk darf allerdings nicht im Vakuum sein, weil es sonst zu Überschlägen kommen kann.

Die Fokussierungseigenschaften der Dynoden werden schon durch schwache Magnetfelder empfindlich gestört (Va 74). Zur Abschirmung dient ein Zylinder aus MU-Metall, der auch Störungen durch elektrostatische Felder verhindert.

Die Kühlkammer (Abb. 3) wurde einem erprobten Modell nachgebaut (We).

Der Kühlmantel um den PM hat eine Länge von 50 mm und kühlt damit die Kathode und die ersten Dynoden. Für den Übergang von der Kühltemperatur zur Zimmertemperatur am Ende des PM stehen 40 mm zur Verfügung, so daß es nicht zu thermisch bedingten mechanischen Spannungen im Glas kommen kann. Der Innendurchmesser beträgt 65 mm. Damit bleibt bei einem PM bis zu einem Außendurchmesser von 50 mm genügend Platz für den Zylinder aus MU-Metall und

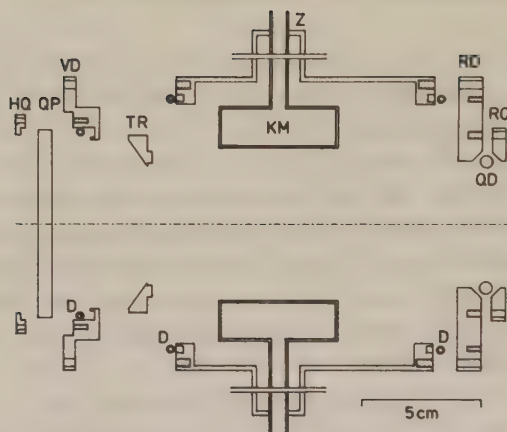


Abb. 3 Kühlkammer

HQ - Halterung für die Quarzplatte	QP - Quarzplatte
VD - Vorderer Deckel	D - Dichtung
TR - Teflonring	KM - Kühlmantel
Z - Zuführung für das Kühlmittel	RD - Rückwärtiger Deckel
QD - Quetschdichtung	
RQ - Ring für die Quetschdichtung	

für Kupferwolle, die den thermischen Kontakt zwischen Kühlmantel und PM herstellen soll. 10 mm vor der Kathode und dem Ende des Kühlmantels befindet sich die Quarzglas-scheibe. Ein Teflonring als Abstandhalter sorgt für eine feste Justierung des PM in dem Kühlmantel. Der Abstand zwischen Kühlmantel und Kühlkammerwand beträgt ebenfalls 10 mm. Diese Isolation reicht bei Vorvakuum aus, denn weder Fenster noch Kühlkammer beschlagen von außen. Lediglich an den Zuführungen für die Kühlschläuche bildet sich Eis. Im rückwärtigen Deckel ist der PM mit einer Quetschdichtung vakuumdicht abgeschlossen. Der Rest des PM ragt mit den Kontaktstiften in den anschließenden Faraday-Becher, der das Netzwerk aufnimmt und elektrische Zuführungen von außen hat.

Zur Temperaturmessung steckt ein Platinwiderstand in der Kupferwolle. In einer Stunde steigt der Druck etwa um 10 torr.

Nach den bisherigen Überlegungen müßten bei beleuchteter Kathode Impulse mittlerer Größe häufiger vorkommen als bei unbeleuchteter Kathode. Das bestätigen einige Autoren (Co 54b, Al 68, Mo 68), andere dagegen finden keinen wesentlichen Unterschied in den entsprechenden Impulshöhenverteilungen (Na 68, Ol 68). Wenn die mittleren Impulshöhen bevorzugt auftreten, und wenn nur solche Impulse gezählt werden, die die untere Schwelle h überschreiten, eine obere Schwelle aber nicht erreichen, dann ermöglicht eine sorgfältige Schwelleneinstellung eine Verbesserung des SNR (siehe nächstes Kapitel). Der Nutzen einer oberen Schwelle wird allerdings bestritten; sie soll zu keiner Erhöhung des SNR beitragen (Al 68). Es ist aber auch mit einem Diskriminator unmöglich, den Untergrund der spontanen Impulse vollständig zu unterdrücken.

Das Rauschen läßt sich nur dadurch weiter reduzieren, daß DZR und HZR in möglichst kurzen Zeitabständen, z.B. binnen einer Sekunde, nacheinander bestimmt werden (Ol 68, Za 72). Auf diese Weise trägt die Drift der DZR im Zeitraum von mehreren Sekunden oder Minuten nicht mehr zur Erhöhung des Rauschens bei.

Diese Aufgabe erfüllt ein Chopper zwischen PM-Kathode und Meßprobe. Für geringe Lichtintensitäten mit Photonenzählraten, die kleiner sind als die DZR, sollte das Verhältnis zwischen den Zeiten, in denen der PM offen bzw. verdeckt ist, 1:1 betragen (Ol 68).

In Abb. 4 ist die Chopperscheibe dargestellt.

Der Chopper soll so groß sein, daß die Öffnung des Quarzfensters mit dem Durchmesser von 72 mm voll ausgenutzt wird. Wenn der Mittelpunkt der Quarzscheibe im Bereich des Winkels φ_H liegt, kann die HZR bestimmt werden, weil die Chopperscheibe das Fenster vollständig freiläßt (Hellphase). Entsprechend wird im gleichgroßen Winkelbereich φ_D die DZR gemessen, weil hier der PM vollständig verdeckt ist (Dunkelphase). In den beiden Übergangsbereichen liegt eine teilweise Bedeckung vor (Winkel φ_t). Um während einer Chopperdrehung eine möglichst lange Meßzeit zu erhalten, müssen die beiden Winkel φ_H und φ_D

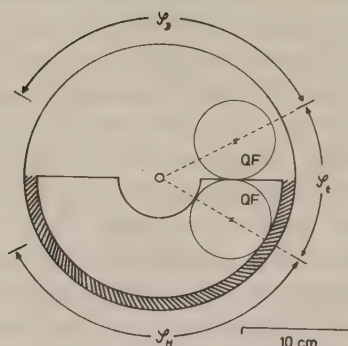


Abb. 4 Chopperscheibe (QF - Größe des Quarzfensters)

möglichst groß sein. Das wird bei gegebenem Durchmesser der Quarzscheibe durch einen großen Chopper erreicht. Bei einem Durchmesser von 25 cm betragen die Winkel

$$\begin{aligned}\varphi_H &= \varphi_D = 119,6^\circ \\ \varphi_t &= 60,4^\circ.\end{aligned}$$

Damit sich die Chopperscheibe nicht ungleichmäßig dreht, ist sie durch Bleistreifen in der schraffierten Fläche ausgewuchtet.

Zur Steuerung der Elektronik dienen zwei Sektorscheiben, die über ein Umlenkgetriebe mit der Chopperscheibe verbunden sind. Sie geben genau dann das Licht einer Glühlampe auf zwei Photowiderstände frei, wenn der Chopper die Quarzscheibe ganz verdeckt bzw. ganz frei läßt. Die entstehenden logischen Impulse (Steuersignale) öffnen bei den entsprechenden Zählern ein Tor (gate).

Der Chopper rotiert mit einer Frequenz von 1 Hz. Er wird von einem Synchronmotor angetrieben, um eine hohe Gleichlaufkonstanz zu erreichen. Das Gehäuse muß sehr flach gebaut sein, weil sich sonst der wirksame Raumwinkel auf Grund des größeren Abstandes zu stark reduziert. Zur Ver-

meidung von Reflexionen ist es im Inneren schwarz lackiert.

Die biologischen Objekte befinden sich in einer Quarzglasküvette der Größe von $45 \cdot 12,5 \cdot 12,5 \text{ mm}^3$. Die Strahlung aus der Küvette, die einen Abstand von 43 mm zur PM-Kathode hat, muß zu einem möglichst großen Teil auf die PM-Kathode gelenkt werden. Dazu dient ein Spiegel, der die zur Seite und nach hinten emittierte Strahlung auf die Kathode reflektiert.

Bei der einfachsten Anordnung steht die Küvette direkt hinter dem Chopper in einem Hohlspiegel (Abb. 5).

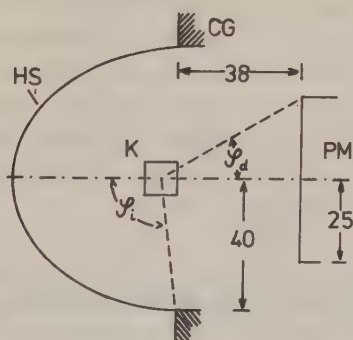


Abb. 5 Raumwinkelverhältnisse beim Hohlspiegel (HS)
(Längenangaben in mm, CG - Choppergehäuse,
K - Küvette)

Die Strahlung innerhalb des Winkels φ_d trifft direkt die Kathode. Die Strahlung im Winkel φ_i dagegen trifft die Kathode erst nach Reflexion an dem Hohlspiegel. Für die angegebenen Maße haben die Winkel die Größe von

$$\varphi_d = 30^\circ \quad \text{u.} \quad \varphi_i = 97^\circ.$$

Nach der Formel

$$\Omega = 2 \pi (1 - \cos \varphi) \quad (3)$$

lassen sich die zugehörigen Raumwinkel berechnen.

$$\Omega_d = 0,85 \quad \Omega_i = 7,1$$

Eine alternative Spiegelanordnung ist ein Abschnitt eines von innen verspiegelten Rotationsellipsoids (Abb. 6). Dabei steht die Küvette noch etwas weiter von der PM-Kathode entfernt, so daß der wirksame Raumwinkel für die direkt auftreffende Strahlung noch kleiner wird, dafür vergrößert sich aber der Raumwinkel für die reflektierte Strahlung wesentlich.

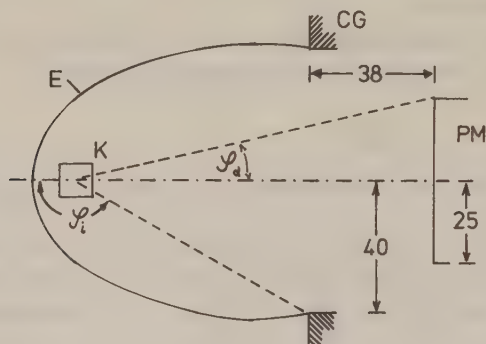


Abb. 6 Raumwinkelverhältnisse beim Ellipsoid (E)
(Längenangaben in mm, CG - Choppergehäuse,
K - Küvette)

Die Photokathode liegt in der Ebene durch den Fixpunkt senkrecht zur Symmetrieachse des Ellipsoids. Die Kathode muß das fortgesetzt gedachte Ellipsoid fast ganz ausfüllen. In dem anderen Fixpunkt des Ellipsoids steht die Küvette, so daß nach der Ellipseneigenschaft jede Strahlung aus der Küvette, die an der Innenseite des Ellipsoids reflektiert wird, auch die PM-Kathode trifft. Weil die Strahlung nicht exakt aus dem Fixpunkt des Ellipsoids kommt, tritt keine ideale Fokussierung im anderen Fixpunkt auf. Die PM-Kathode hat aber zum Ausgleich eine wesentlich größere Fläche, als es dem Querschnitt der Küvette entspricht.

Die limitierende Blende in dieser Anordnung ist durch die Chopperabmessung bestimmt. Der Abstand vom PM und die Größe der Chopperöffnung, sowie der PM-Durchmesser

legen die Größe des Ellipsoids fest (siehe Abb. 6). Die Halbachsen sind $a = 68,5 \text{ mm}$ und $b = 41,4 \text{ mm}$.

Der Mittelpunkt des Ellipsoids liegt 17 mm vor dem Choppergehäuse, und der Abstand zwischen Kathode und Küvette beträgt jetzt ca. 11 cm. Für die Winkel und Raumwinkel ergeben sich

$$\begin{aligned} \varphi_d &= 13^\circ \text{ und } \varphi_i = 151^\circ \\ \text{bzw. } \Omega_d &= 0,16 \text{ und } \Omega_i = 11,8. \end{aligned}$$

Die Fokussierungsmöglichkeiten sind allerdings ungünstiger, wenn man berücksichtigt, daß die Höhe der Küvette mit 45 mm etwa dem PM-Durchmesser gleicht. Aber keines der beiden Spiegelsysteme behebt diese Schwierigkeit.

Als Spiegelfläche dient poliertes Aluminium. Ein Teil der Strahlung geht bei der Reflexion verloren. Bei der Berechnung des gesamten wirksamen Raumwinkels Ω_g wird das entsprechend der Gleichung

$$\Omega_g = \Omega_d + \rho \Omega_i \quad (4)$$

berücksichtigt, wobei ρ der Reflexionskoeffizient ist. Die Reflexion unter 45° an poliertem Aluminium zeigt Abb. 7.

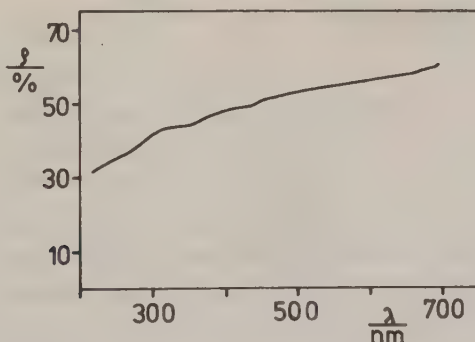


Abb. 7 Reflexion an poliertem Aluminium
(Einfallswinkel 45°)

Mit dem Reflexionskoeffizienten hängt auch der wirksame Raumwinkel von der betrachteten Wellenlänge ab. Nach einem Vergleich zwischen beiden Spiegelanordnungen ist

der wirksame Raumwinkel bei dem Rotationsellipsoid größer, sobald der Reflexionskoeffizient 14 % übersteigt. Das aber gilt bei allen Wellenlängen über 250 nm, so daß das Rotationsellipsoid in diesem Fall die beste Methode zur Raumwinkelvergrößerung ist.

Wenn Tageslicht auf die PM-Kathode fällt, erhöht sich die Dunkelzählrate beträchtlich, auch wenn keine Spannung anliegt. Dieser Effekt sinkt mit Halbwertszeiten zwischen einigen zehn Minuten und einigen Stunden ab (Co 54b, Ro 63, Na 68, Ol 68). Daher muß die Küvette mit den Proben in Meßposition vor den PM gebracht werden, ohne daß Licht auf die PM-Kathode fällt. Dazu dient eine Lichtschleuse, die zusammen mit dem Ellipsoid in Abb. 8 dargestellt ist.

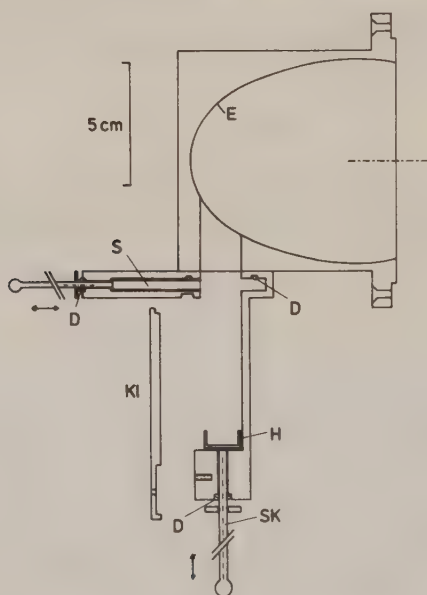


Abb. 8 Lichtschleuse mit Ellipsoid

- | | |
|--|---|
| E - Verspiegelte Ellipsoidfläche | H - Halterung für die Küvette |
| S - Schieber zum Verschließen des Ellipsoids | Kl - Klappe zum Schließen des Schachtes |
| SK - Schieber für die Küvette | |
| D - Dichtung | |

Die Küvette K wird bei geschlossenem Schieber S in die Halterung H eingesetzt. Nach Schließen der Klappe Kl und Öffnen von S wird die Küvette nach oben in das Ellipsoid in Meßposition geschoben. Für Kontrollmessungen bleibt die Küvette im Schacht, so daß kein Licht aus der Küvette auf die PM-Kathode fällt.

Zur Aufnahme des Spektrums der Strahlung aus biologischen Objekten dient eine Filterhalterung zwischen Ellipsoid und Chopper (siehe Abb. 9).

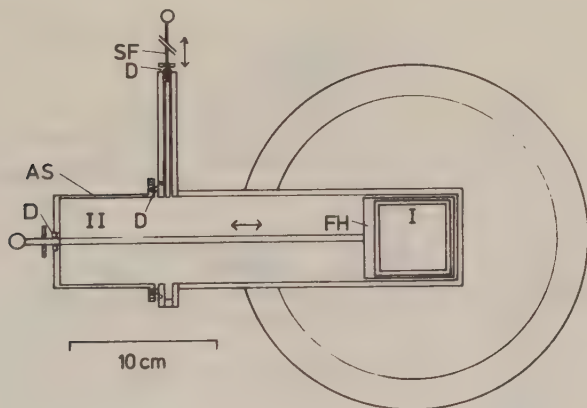


Abb. 9 Filterwechsler

FH - Filterhalterung

SF - Schieber für den Filterschacht

AS - abnehmbarer Schachtteil

D - Dichtung

Auch bei einem Filterwechsel darf kein Licht auf die PM-Kathode fallen. Aus diesem Grund wird der Filter von der Position I während der Messung nach II geschoben, der Schieber SF geschlossen und der Schachtteil AS zum Filterwechsel abgenommen.

Der gesamte mechanische Aufbau der Apparatur ist in Abb. 10 dargestellt.

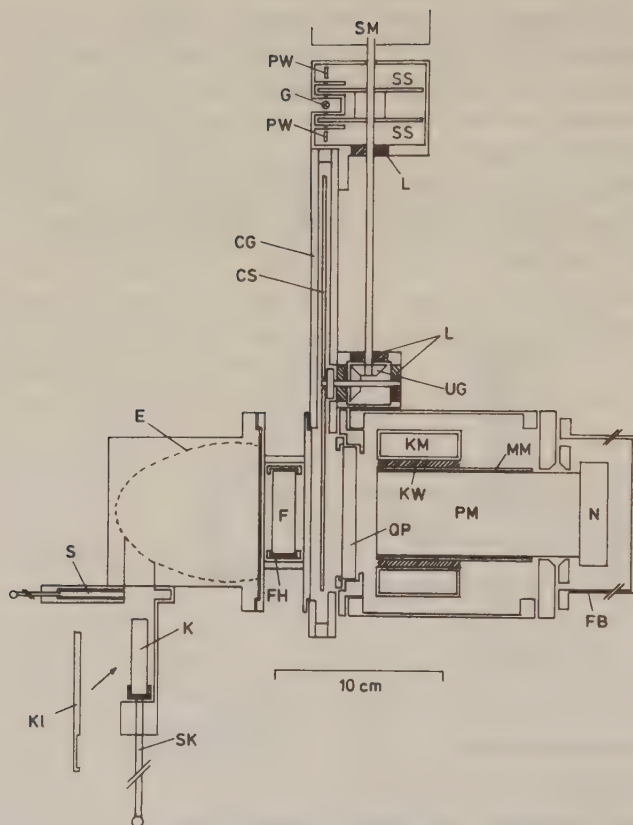


Abb. 10 Die Apparatur mit Filterhalterung

SM - Synchronmotor	PW - Photowiderstand
G - Glühlampe	SS - Steuerscheibe
L - Lager	UG - Umlenkgetriebe
CS - Chopperscheibe	MM - MU-Metall
KW - Kupferwolle	N - Netzwerk
K - Kuvette	F - Filter
FB - Faradaybecher	

Weitere Erklärungen siehe Abb. 3, 8 und 9.

2.3. Der elektronische Teil

Der Photomultiplier muß folgende Anforderungen erfüllen:
empfindlicher Wellenlängenbereich von 200 bis 700 nm,
hohe Quantenausbeute und
geringe Dunkelzählrate.

Von den zur Verfügung stehenden Modellen eignet sich der PM EMI 9558 QB am besten. Seine wesentlichen Eigenschaften sind in Tab. 2 aufgeführt.

Tab. 2 Eigenschaften des PM EMI 9558 QB

Maximaler Außendurchmesser	51,4 mm
Minimaler Kathodendurchmesser	44 mm
Kathodentyp	S(20)Q
Dynodenzahl	11
Kapazität Anode-Dynoden	8 pF
Stromverstärkung	$10^6 - 10^7$
Impulsbreite	15 ns
Dunkelstrom	10 nA
Grenze des thermisch bedingten Dunkelstroms	-40 °C

Die Quantenausbeute q der Kathode in Abhängigkeit von der Wellenlänge λ zeigt Abb. 21.

Das Netzwerk des PM dient zur Herstellung eines konstanten elektrischen Potentials für die Dynoden und zur Übertragung der Impulse von der Anode in den Verstärker. Diese Schaltung kann selbstverständlich nicht zur Erhöhung der Quantenausbeute beitragen.

Allerdings erzeugt das Netzwerk Störungen, insbesondere kleine Impulse durch das Einfangen von RF-Wellen, Reflexionen und Eigenrauschen, und beeinflusst damit auch die Impulshöhenverteilung (Fo 69).

Die Methode der Impulszählung erlaubt einen Betrieb des PM mit geerdeter Kathode (Ro 63, Ga 65, Mo 68, Jo 71). Das ist vorteilhaft für das MU-Metall zur magnetischen Abschirmung, das dann geerdet werden kann. Kathode und

MU-Metall sollen auf gleichem Potential liegen, weil dann keine Spitzenentladungen oder Kriechströme auf Grund einer Potentialdifferenz zum Gehäuse hin auftreten. Außerdem verbessert sich der thermische Kontakt zwischen Kühlmantel und PM, da eine elektrische Isolation unnötig ist.

Abb. 11 zeigt die benutzte Schaltung.

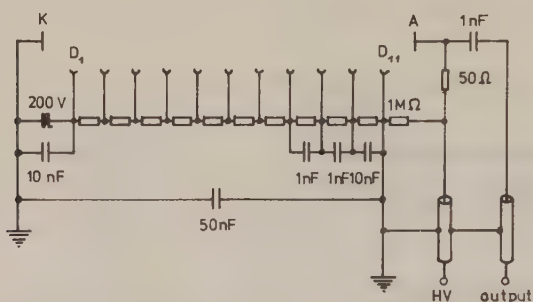


Abb. 11 Schaltskizze des PM-Netzwerkes

K - Kathode

A - Anode

D - Dynode

HV - Hochspannungsversorgung

Alle Widerstände ohne Bezeichnung haben den Widerstand $1M\Omega$

Ein rauscharmer, spannungsfester Kondensator (3 kV) der Kapazität von 1 nF entkoppelt die Anode gleichspannungsmäßig von dem Verstärkereingang (Ga 65, Za 72). Der Arbeitswiderstand von 50Ω ist dem Wellenwiderstand des Kabels zum Verstärker angepaßt.

Damit das Potential der Dynoden auch während des Betriebes des PM konstant bleibt, muß der Netzwerkstrom groß im Vergleich zum Photostrom sein. Andererseits darf der Strom die Widerstände nicht erwärmen, so daß ein Verhältnis von 50:1 bis 100:1 zwischen den beiden Strömen ausreicht (Va 74). Die Widerstandskette besteht deshalb aus $1M\Omega$ -Widerständen. Zwischen Kathode und der ersten Dynode erhält eine Zener-Diode eine konstante Spannung von 200 V aufrecht (EMI). Bei 1500 V Gesamtspannung fließt damit ein Strom von annähernd $120\mu A$, und die Leistungsaufnahme

beträgt ca. 0,2 W. Ein Kondensator von 10 nF glättet die Spannung an der Zener-Diode. Da Zener-Dioden während des Betriebs auch Licht aussenden können, sind sie eingehüllt worden. Bei den letzten Dynoden verhindern Kondensatoren der Kapazität von 10 nF bzw. 1 nF Störungen durch HF-Einstreuungen (Za 72). Auch die angelegte Hochspannung wird durch einen Kondensator von 50 nF geglättet.

Die Bauteile sind auf einem Teflonsockel montiert und zusätzlich noch einmal durch geerdete Zylinder abgeschirmt. Eine doppelte Abschirmung der Kabel zur Hochspannung und zum Verstärker verringert die Dunkelzählrate.

Die Zeitkonstante des RC-Gliedes an der Anode ist mit 50 ns größer als die Impulsdauer des PM von 15 ns. Zur Abschätzung der erwarteten Impulshöhe wird daher die Impulsdauer im Vergleich zur Zeitkonstanten vernachlässigt. Der Spannungsimpuls hat eine Höhe von $U = Q/C$. Die Ladung Q errechnet sich aus der Elementarladung e und der mittleren Stromverstärkung $V = 5 \cdot 10^6$. Für die Kapazität C wird die des Koppelkondensators (1 nF) eingesetzt, da die Kapazität der Anode gegenüber den Dynoden (8 pF) vernachlässigbar klein ist. Damit entsteht am Ausgang ein Impuls der Höhe von $U \approx 1$ mV mit einer Impulsbreite von $\tau \approx 50$ ns. Diese Impulse müssen für den Diskriminator noch ausreichend verstärkt werden. Die Anstiegszeit des Verstärkers sollte etwa der Zeitkonstanten des Netzwerkes entsprechen. Zur SNR-Verbesserung braucht man einen Diskriminator mit einer einstellbaren unteren Schwelle.

Außerdem darf er nicht für sehr hohe und lange Impulse zwei oder mehr Ausgangssignale abgeben.

Diese Anforderung erfüllt der Verstärker/Diskriminator LB 2251 (Fa. Berthold, Wildbad). Bei der maximalen Verstärkung von 200 entstehen Impulse von 200 mV. Für die Impulsformung stehen Zeitkonstanten zwischen 0,1 μ s und 5 μ s der Integrations- und Differentiationsschaltung zur Verfügung. Durch ein Potentiometer ist die untere Diskriminatorschwelle zwischen 20 mV und 2020 mV auf 1 mV genau einstellbar ($h = 0,00 - 10,00$). Die Ausgangsimpulse haben eine Höhe von 10 V und eine Länge von 500 ns. Die Totzeit des Gerätes beträgt 1 μ s.

Der Ausgang des Diskriminators wird mit zwei gleichzeitig gebauten Zählern verbunden (siehe Abb. 12, De).

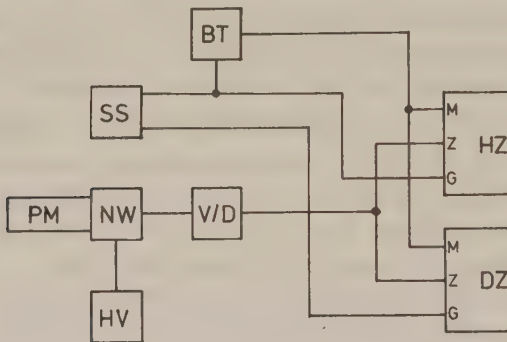


Abb. 12 Elektronische Schaltung

NW - Netzwerk	V/D - Verstärker/Diskriminator
SS - Steuerscheiben	HV - Hochspannungsversorgung
BT - Binärteiler	HZ - Hellzähler
DZ - Dunkelzähler	Z - Zählereingang
G - Gate	M - Steuerung des Meßintervalls

Aber die Steuersignale der Sektorscheiben am Chopper stellen jeweils nur einen Zähler an. Bedeckt der Chopper den PM, dann werden die Impulse im Zähler DZ registriert (Zähler für die DZR), wird der PM ganz freigegeben, dann ist der Zähler HZ in Betrieb (Zähler für die HZR). Ein Binärteiler untersetzt ein Steuersignal und legt das Meßintervall je nach Einstellung zwischen 2 s und 2^{11} s (≈ 34 min) fest. Nach Ende des Meßintervalls erscheinen die Zählerinhalte auf einer Anzeige, so daß die Differenz beider Werte die Zahl der Impulse angibt, die während des Meßintervalls durch Photonen hervorgerufen werden.

2.4. Test der Apparatur

Wenn am PM keine Spannung anliegt, treten keine zählbaren Impulse auf. Das Netzwerk alleine verursacht also keine Störungen. Zum Test der Anlage werden die abge-

schwächten Impulse eines Generators auf den Eingang des Verstärkers gegeben. Sind beide Zähler eingeschaltet, dann zeigen sie bis zu einer Frequenz von 500 kHz den gleichen Zählerstand an. Das ändert sich auch nicht bei anderen Impulsformen.

Um die genaue Zeitdauer für Hell- und Dunkelphase in einem Chopperzyklus von 1 s zu bestimmen, wird die Frequenz geeicht. Wenn dann die Zähler von den Steuer-scheiben des Choppers ein- und ausgeschaltet werden, lassen sich die Zeitintervalle aus den Zählerständen errechnen:

Hellphase	334 ms
Dunkelphase	333 ms
Zwischenphase	334 ms

Die Fehler dieser Zeitintervalle überschreiten auch bei längeren Beobachtungszeiten bis zu einer Stunde nicht 0,5 ms. Die Differenz zwischen den drei Phasenzeiten ist so gering, daß ein Chopperzyklus in drei Phasen gleicher Zeitdauer eingeteilt wird. Der entstehende Fehler läßt sich im Vergleich zu den Meßfehlern vernachlässigen.

Der PM weist bei -40°C und bei einer Diskriminatorschwelle von $h = 1,0$ eine DZR von etwa 40 cps auf. Nach Einschalten oder Änderung der Spannung bleibt die DZR konstant, im Gegensatz zur Ansicht einiger Autoren (Mo 68, Co 71). Nach Belichten des PM ohne angelegte Spannung erhöht sich die DZR um einen Faktor 2 bis 10. Die DZR fällt dann mit einer Halbwertszeit von etwa 15 min ab, so daß bei dem PM erst nach einigen Stunden eine Stabilisierung eintritt (vgl. Ol 68). Allerdings scheinen Effekte mit unterschiedlichen Halbwertszeiten beteiligt zu sein.

Die Fugen zwischen den verschiedenen Bauteilen sind mit mehreren Lagen von schwarzem Isolierband überklebt. Bei einem Test der Lichtdichtigkeit zeigt sich in einem hell erleuchteten Raum und einem vollständig verdunkelten Raum kein Unterschied in den Zählraten, folglich ist die Apparatur lichtdicht abgeschlossen. Auch während der Einschleusung der Proben dringt kein Licht in die Apparatur.

Bei einer lichtdichten Anlage sollte man gleiche Hell- und Dunkelzählraten erwarten, wenn keine strahlenden Objekte im Inneren sind. Erstaunlicherweise ist jedoch die DZR größer als die HZR.

Dieser Effekt wird durch die schwarze Chopperscheibe erklärt. Sie strahlt entsprechend der Gesetze über den schwarzen Körper auf Grund ihres höheren Absorptionsvermögens eine größere Lichtintensität ab als das verspiegelte Ellipsoid, das sie während der Hellphase freigibt. Die Differenz der Zählraten ist stark von der Temperatur abhängig: Eine Erhöhung der Temperatur der Chopperscheibe von 35 °C auf 50 °C zieht ein Ansteigen der Zählratendifferenz von -50 cps auf -500 cps nach sich. Dabei bleibt der PM selbst auf einer konstanten Temperatur von -40 °C. Wenn eine schwarze Pappe das Ellipsoid direkt hinter dem Chopper abdeckt, hängt die Zählratendifferenz nur noch schwach von der Temperatur ab. Ein Aufheizen des Ellipsoids allein erhöht nur die Hellzählrate. Diese Temperaturabhängigkeit kann quantitativ durch die Gesetze über die Strahlung des schwarzen Körpers erklärt werden, wenn die Empfindlichkeit des PM exponentiell in den IR-Bereich bis 2000 nm extrapoliert wird. Bei Zimmertemperatur beträgt die Differenz der beiden Zählraten

$$n_H - n_D = (-1,2 \pm 0,4) \text{ cps.}$$

3. Einstellung und Eichung

Bei allen Messungen bleibt der Druck in dem PM-Gehäuse unter 50 torr, um eine ausreichende thermische Isolation des PM zu gewährleisten. Folgende Einstellungen von dem Verstärker/Diskriminator bleiben bei allen Messungen unverändert:

Verstärkung	200
Zeitkonstante für die Differentiation	1 μ s
Zeitkonstante für die Integration	0,1 μ s
Eingangspolarität	negativ
Betriebsart	"int"
Obere Diskriminatorschwelle	10,50
Kontrolle E_1	"int"

Untere Diskriminatorschwelle h , PM-Spannung U und PM-Temperatur T müssen so gewählt werden, daß die Anlage weitgehend unbeeinflußt von Störungen eine möglichst niedrige Nachweisgrenze hat. Darum dürfen Schwankungen von h , U und T nur eine geringe Wirkung auf Hell- und Dunkelzählrate hervorrufen, d.h. die Steigungen der entsprechenden Abhängigkeiten sollten in den Arbeitspunkten möglichst gering sein. Im folgenden wird deshalb die Abhängigkeit der entsprechenden Zählraten von den drei Größen h , U und T untersucht.

3.1. Abhängigkeit der Zählraten von Spannung, Temperatur und Diskriminatorschwelle

Die Spannungsabhängigkeit der Dunkelzählrate bei verschiedenen Diskriminatorschwellen und bei der Temperatur $T = -25^\circ\text{C}$ ist in Abb. 13 dargestellt.

Die DZR steigt mit der Spannung an, aber der Kurvenverlauf wird mit zunehmender Spannung bis 1500 V flacher, so daß sich ein Plateau andeutet. Ebenso sind die Kurven bei niedriger Diskriminatorschwelle flacher als bei höherer. Eine möglichst hohe Spannung und niedrige Diskriminatorschwelle vermindern also die Empfindlichkeit der Dunkelzählrate von Spannungsschwankungen.

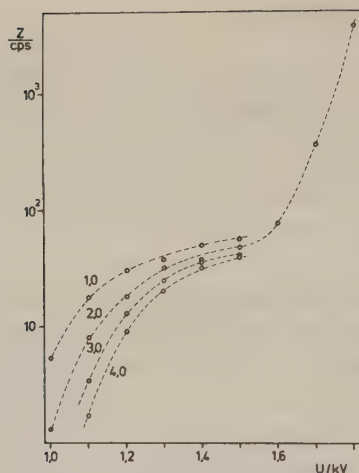


Abb. 13 Spannungsabhängigkeit der Dunkelzählrate bei verschiedenen Diskriminatoreinstellungen h
($T = -25^\circ\text{C}$)

Ein weiteres Erhöhen der Spannung über 1500 V hinaus läßt die Dunkelzählrate wieder stark ansteigen. Vermutlich setzt bei diesen Spannungen eine Ionenlawine ein, weil nun die DZR kaum von der Temperatur abhängt und die Impulse im Gegensatz zu niedrigeren Spannungen (vgl. Abb. 15) eine rein exponentielle Höhenverteilung aufweisen.

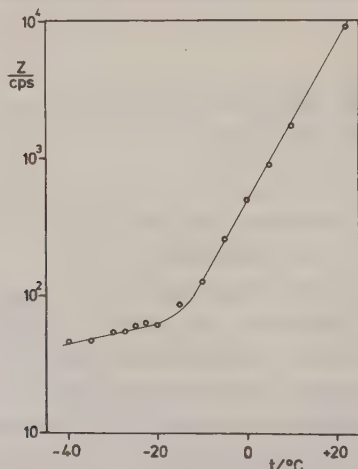


Abb. 14 - Abhängigkeit der Dunkelzählrate von der Temperatur
(Diskriminatorschwelle $h = 1,0$, Spannung $U = 1500\text{V}$)

Außerdem erhöht sich die DZR nach einmaligem Überschreiten von 1700 V, auch wenn anschließend wieder Spannungen unter 1500 V eingestellt werden. Der PM braucht dann einige Stunden, bis er wieder das anfängliche Verhalten erreicht. Aus diesem Grund ist ein Betrieb nur bis 1500 V möglich. Die Temperaturabhängigkeit der DZR zeigt Abb. 14. Im Bereich bis -10°C sinkt die Zählrate entsprechend dem Richard'schen Gesetz exponentiell um etwa zwei Zehnerpotenzen ab (Ro 63). Nach einer Übergangsphase ist dann zwischen -20°C und -40°C eine exponentielle Abnahme mit der Temperatur zu sehen. Danach spielt die thermisch bedingte DZR nur bis zu einer Temperatur von -20°C eine Rolle. Die verbleibenden Impulse gehen auf andere Ursachen zurück und sind durch die Temperatur kaum zu reduzieren. Die Zählrate bleibt über mehrere Tage hinweg konstant und ein weiteres signifikantes Absinken durch eine Dauerkühlung ist nicht festzustellen.

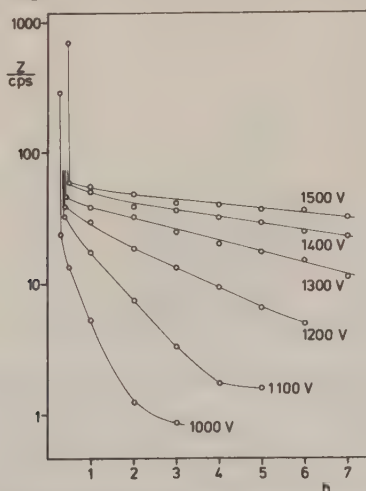


Abb. 15 Impulshöhenverteilung des unbeleuchteten PM bei verschiedenen Spannungen ($T = -25^{\circ}\text{C}$)

Nach der Impulshöhenverteilung (Abb. 15) nimmt die Zahl der Impulse für kleine Impulshöhen stark zu. Für große Impulse werden die Kurven bei zunehmender Spannung immer flacher und nähern sich einer Exponentialfunktion.

Der Übergangsbereich zwischen beiden Kurventeilen verkleinert sich mit steigender Spannung. Auch nach dieser Darstellung ist eine möglichst hohe Spannung zu wählen, um die Auswirkungen von Schwankungen der Diskriminator-schwelle auf die DZR gering zu halten.

Die geringe Temperaturabhängigkeit der kleinen Impulse bestätigt, daß sie nicht durch Elektronenemission der Kathode verursacht werden. Daher beeinträchtigt die Diskriminierung vermutlich nicht die Quantenausbeute der Anlage wesentlich.

3.2. Versuchsaufbau zur Optimierung und Eichung

Zur Untersuchung der HZR, zur Optimierung des SNR und zur Eichung dient der Versuchsaufbau in Abb. 16.

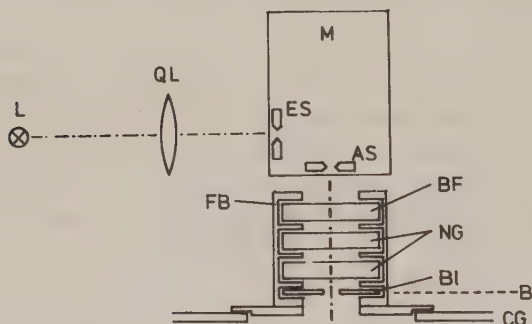


Abb. 16 Versuchsaufbau zur SNR-Messung und Eichung

L - Lampe	QL - Quarzlinse
M - Monochromator	ES - Eintrittsspalt
AS - Austrittsspalt	FB - Filterbehälter
BF - Bandfilter	NG - NG9-Neutralfilter
Bl - Blende	B - Bildebene von M
CG - Choppergehäuse	

Die Quarzlinse QL fokussiert das Licht einer Wolfram-Jod-Lampe (24 V, 250 W) auf den Eintrittsspalt eines Monochromators. Lampe und Monochromator sind nach der Justierung

starr verbunden. In der Bildebene des Monochromators - 8 cm vor dem Austrittsspalt - entsteht ein Lichtfleck der Größe $19 \cdot 16 \text{ mm}^2$. Änderungen der Höhe und Breite von Ein- und Austrittsspalt können die Intensität variieren, beeinflussen aber nicht die Größe und Form des Flecks. Folgende Werte sind am Monochromator eingestellt:

Wellenlänge	405 nm			
Eintrittsspalt Höhe	20 mm	Breite	10 mm	
Austrittsspalt "	20 mm	"	8 mm	

Zur Eichung und Optimierung ist anstelle von Ellipsoid und Filterhalterung ein Behälter für mehrere Filter eingebaut. Blenden zwischen den Filtern und eine schwarze Lackierung im Inneren verhindern, daß durch Reflexion Licht an der Seite der Filter vorbei gelangen kann. Die Fugen des Behälters sind mit schwarzem Isolierband verklebt, damit kein Licht in die Apparatur dringt.

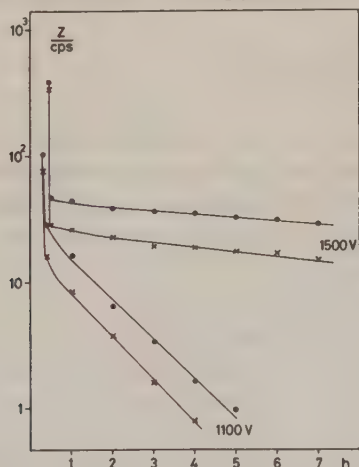


Abb. 17 Impulshöhenverteilung bei beleuchtetem (●) und unbeleuchtetem (×) Photomultiplier

Das Licht aus dem Monochromator passiert zunächst ein 405nm-Bandfilter zum Ausfiltern von Nebenmaxima. In der Bildebene steht eine Blende B1 vom Durchmesser 5,5 mm, die damit wesentlich kleiner als der Lichtfleck ist. Nach einer Vergleichsmessung mit einer Photodiode fällt

durch die Blende eine Leistung von $4 \cdot 10^{-6}$ W. Für die Messung mit dem PM wird das Licht durch mehrere Neutralfilter NG9 um den Faktor $4 \cdot 10^{10}$ abgeschwächt. Damit treffen etwa 200 ± 2 Photonen/s auf die PM-Kathode. Die Abb. 17 zeigt die Impulshöhenverteilung vom beleuchteten und unbeleuchteten PM im Vergleich.

Beide Impulshöhenverteilungen sind für kleine Impulse in ihrem starken Anstieg fast identisch und unterscheiden sich erwartungsgemäß nur bei großen Impulsen. Photonen erzeugen also vorwiegend große Impulse.

Die zwei Kurven verlaufen in logarithmischer Darstellung für beide angeführten Spannungen nahezu parallel. Deshalb spricht auch die geringe Steigung der Impulshöhenverteilung mit beleuchteter Kathode für einen Betrieb mit hoher Spannung.

3.3. Optimierung des SNR

Durch die Wahl von Temperatur, Spannung und Diskriminatorschwelle kann das SNR verändert und damit optimiert werden (Mo 68, Ro 70). Die optimale Einstellung hängt geringfügig von der betrachteten Intensität ab (Na 68).

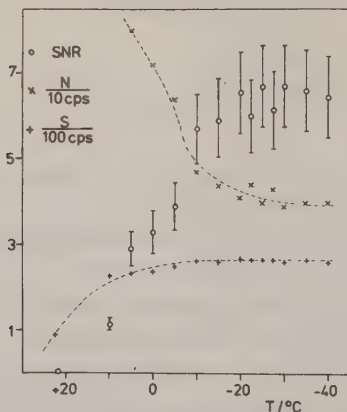


Abb. 18 Abhängigkeit des SNR von der Temperatur
(S - Signal, N - Noise, U = 1500 V, h = 1,0)

Die Optimierung erfolgt deshalb auch mit einer Intensität, die von den biologischen Objekten zu erwarten ist. Bei ungeändertem Versuchsaufbau wird das Licht auf etwa 1000 Photonen/s abgeschwächt.

Bei der Optimierung werden die Temperatur zwischen $+22^{\circ}\text{C}$ und -40°C , die Spannung zwischen 1000 V und 1500 V und die Diskriminatorschwelle zwischen 0,40 und 10,00 variiert. Als wesentliche Größen gehen in das SNR die Streuung von Hell- und Dunkelzählrate ein (vgl. Gl. 2). Der relative Fehler der Streuung ergibt sich bei n Messungen zu (Zu 65)

$$\frac{\Delta \xi}{\xi} = \frac{\sqrt{2n}}{n-1} \quad (5)$$

Bei 200 Messungen von 8 s Dauer je Einstellung beträgt also der relative Fehler der Streuung etwa 10 %.

Die Temperaturabhängigkeit des SNR bei $U = 1500\text{ V}$ und $h = 1,0$ ist in Abb. 18 dargestellt. Die Kurve steigt bis -20°C an und bleibt anschließend bis -40°C auf gleicher Höhe. Die Quantenausbeute, das Signal, vergrößert sich bis 10°C stark, weiter bis -10°C nur noch schwach und behält dann bis -40°C einen konstanten Wert. Die photoelektrischen und multiplizierenden Eigenschaften sind damit weitgehend temperaturunabhängig. Die Streuung nimmt bis -20°C ab und bleibt dann auf einem konstanten Wert. Da die DZR selbst noch weiter absinkt (vgl. Abb. 14), verschlechtert sich damit das statistische Verhalten im Vergleich zur Poisson-Statistik. Die Abnahme der Streuung bleibt auf den Bereich beschränkt, in dem thermisch bedingte Impulse auftreten und ist vermutlich auch nur auf deren Reduktion zurückzuführen. Ein Abkühlen des PM unter -25°C verbessert das SNR nicht.

Abb. 19 zeigt die Spannungsabhängigkeit des SNR bei $T = -25^{\circ}\text{C}$ und $h = 1,0$. Die Quantenausbeute steigt mit zunehmender Spannung kontinuierlich an, weil die kleinen Impulse dadurch mehr verstärkt werden und in ihrer Höhe die Diskriminatorschwelle übersteigen. Die Streuung dagegen nimmt weniger stark zu und behält zwischen 1300 V und 1500 V sogar annähernd ihren Wert bei. Die relative

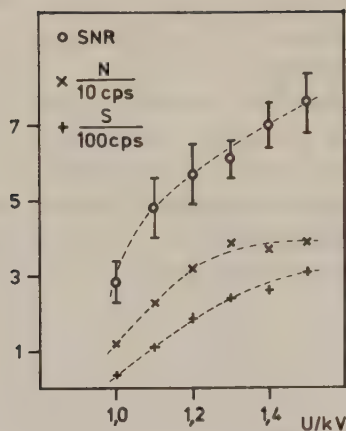


Abb. 19 Abhängigkeit des SNR von der PM-Spannung
($T = -25^\circ\text{C}$, $h = 1,0$)

Streuung verringert sich damit bei zunehmender Spannung. Insgesamt nimmt das SNR mit steigender Spannung zu, so daß als Arbeitspunkt eine möglichst hohe Spannung zu wählen ist.

Die Abhängigkeit des SNR von der Diskriminatorschwelle erreicht bei $h = 1,0$ ein Maximum (Abb. 20).

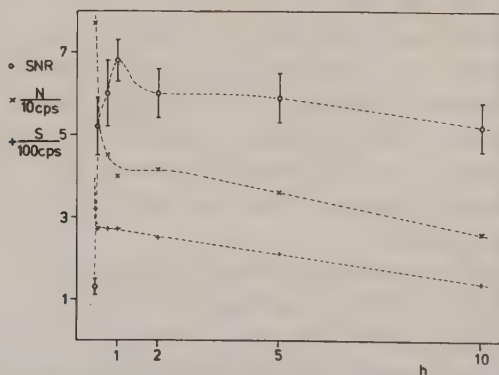


Abb. 20 Abhängigkeit des SNR von der Diskriminator-schwelle h ($T = -25^\circ\text{C}$, $U = 1500 \text{ V}$)

Die Quantenausbeute bei niedrigen Schwellen übersteigt die der Kathode selbst. Das kann nur dadurch erklärt

werden, daß ein Photon im Durchschnitt mehr als einen Impuls erzeugt, der die eingestellte Schwelle überschreitet. Möglicherweise geschieht das durch verzögerte Elektronenemission aus einer der ersten Dynoden. Bei den Impulshöhen, an denen die Impulshöhenverteilung abknickt (vgl. Abb. 15 und 17, $h \approx 0,5$), erreicht das Signal eine Größe, die der Quantenausbeute der Kathode entspricht. Bei größeren Diskriminatorschwellen sinkt das Signal nur langsam ab. Die Streuung vermindert sich nicht so rasch und erreicht erst bei $h = 1,0$ einen Wert, der dann nur langsam abnimmt. Da der Noise-Wert für $h = 1,0$ geringfügig unter dem von $h = 2,0$ liegt, ist das Maximum möglicherweise in Wirklichkeit nicht so ausgeprägt wie in der Messung.

Die optimalen Arbeitspunkte für die Apparatur sind somit:

$$T = -25 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

$$U = 1500 \text{ V}$$

$$h = 1,0,$$

3.4. Eichung

Für die Aufnahme des Spektrums zwischen 320 nm und 750 nm stehen die Bandfilter nach Tab. 3 zur Verfügung.

Bei einigen Filtern treten neben den Hauptdurchlaßstellen bei λ_m auch noch Nebendurchlaßstellen bei λ_n auf. In der Auswertung muß das durch eine Korrektur berücksichtigt werden.

Die Eichung der Anlage erfolgt bei den angegebenen Filterwellenlängen, auf die der Monochromator eingestellt wird (vgl. Abb. 16). Der jeweilige Filter selbst eliminiert die Nebenmaxima. Zwei Lichtmeßgeräte bestimmen unabhängig voneinander die Lichtintensität bei den verschiedenen Wellenlängen in der Bildebene des Monochromators.

Eine Photodiode (Instr. Technology FD 125 U 20) mißt den Photonenstrom I_p , der durch eine Blende in der Bildebene fällt. Die Blende hat die gleiche Größe wie die vor dem PM (5,5 mm $\varnothing$) und ist wesentlich kleiner als die empfindliche Fläche der Photodiode.

Tab. 3 Bandbreiten und Transmissionen der verwendeten Filter

λ /nm	$\Delta \lambda$ /nm	$T_{\max}$ /%
331,5	7	43
351	10,5	29,5
369	9	31,5
400	21,5	40
415	19	34,5
433	22	51,5
450	22	57
480	20	54,5
501	21	43
528	12,5	24
543	20,5	66,5
576	22	62
601	21	60
639	13	35
692	13	37
736	9,5	37
Nebenpeaks λ_N der Filter 433, 450 und 480 nm		
360	30	3
365	15	2
380	17	12,5

Mit einem Fluxmeter (HP 8330 A) wird direkt die Photonenstromdichte gemessen. Dabei steht die empfindliche Fläche des Gerätes, die klein im Verhältnis zur Strahlfleckgröße ist, in der Bildebene des Monochromators. Durch Multiplikation mit der Blendenfläche erhält man den Photonenstrom I_{HP} . Beide Messungen sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Nun wird die PM-Kathode in der Bildebene aufgestellt und die Zählrate Z des einfallenden abgeschwächten Lichtes bestimmt. Die Abschwächung erfolgt mit mehreren NG9-Filtern,

Tab. 4 Die Quantenausbeute der Anlage

λ/nm	$\frac{I_p}{10^{11} \frac{\text{P.}}{\text{s}}}$	$\frac{I_{HP}}{10^{11} \frac{\text{P.}}{\text{s}}}$	$\frac{T}{10^{-8}}$	$\frac{Z}{10^3 \text{ cps}}$	$q_p/\%$	$\Delta q_p/\%$	$q_{HP}/\%$	$\Delta q_{HP}/\%$	$q_K/\%$
736	53,2	41,2	54,4	44,4	1,5	0,1	2,0	0,1	1,7
692	69,8	58,2	5,9	10,6	2,6	0,2	3,1	0,2	3,2
639	68,8	55,9	5,4	14,4	3,9	0,3	4,8	0,4	5,4
601	57,2	51,1	1,9	7,12	6,6	0,6	7,3	0,7	7,4
576	81,1	69,9	1,5	10,4	8,5	0,9	9,9	1,0	8,8
543	71,0	62,3	2,0	15,3	10,8	1,1	12,3	1,2	11,0
528	16,1	13,9	1,7	3,23	11,8	1,2	13,7	1,3	12,3
501	31,4	33,8	1,5	7,81	16,6	1,7	15,4	1,6	14,1
480	29,3	30,1	2,5	12,7	17,3	1,6	16,9	1,6	15,7
450	20,3	21,6	1,5	7,01	23,0	2,4	21,6	2,3	18,1
433	13,7	14,4	0,95	2,89	22,2	2,5	21,1	2,4	19,4

I_p - Photonenstrom, gemessen mit der Photodiode

I_{HP} - Photonenstrom, gemessen mit dem Fluxmeter

T - Transmission der Neutralfilter

Z - Zählrate der Anlage

q_p - Quantenausbeute nach der Messung mit der Photodiode

q_{HP} - " " " " " dem Fluxmeter

q_K - Quantenausbeute der Kathode (EMI)

die je nach Wellenlänge eine Transmission zwischen $5 \cdot 10^{-7}$ und 10^{-8} haben. Auch die Eichung wird damit bei Intensitäten vorgenommen, die von den biologischen Objekten zu erwarten sind. Nach den Messungen mit den Lichtmeßgeräten läßt sich aus dem ungeschwächten Photonenstrom I_p bzw. I_{HP} , der Transmission T und der Photonenzählrate Z der Anlage die Quantenausbeute q_p bzw. q_{HP} nach

$$q = \frac{Z}{J \cdot T}$$

ermitteln.

Unterhalb 450 nm steigt die Absorption der Filter mit abnehmender Wellenlänge stark an, so daß sich der relative

Fehler wesentlich vergrößert. Innerhalb der Halbwertsbreite des 400nm-Filters nimmt die Transmission um den Faktor 72 ab. Deshalb läßt sich eine Lichtintensität unterhalb von 433 nm nicht mehr definiert abschwächen, so daß hier keine direkte Eichung möglich ist. Die errechneten Quantenausbeuten q_P und q_{HP} sind im Vergleich mit der Quantenausbeute der Kathode q_K in Tab. 4 und Abb. 21 aufgeführt.

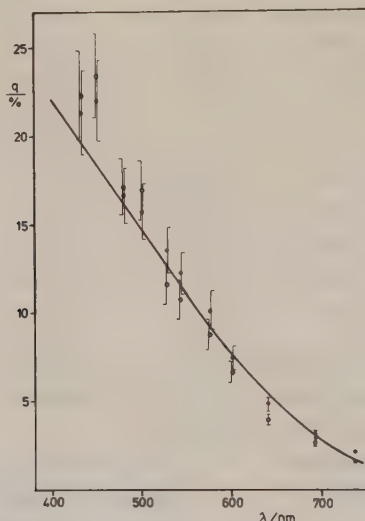


Abb. 21 Die Quantenausbeute der Anlage nach der Eichung mit der Photodiode (○) und dem Fluxmeter (●) im Vergleich zur Quantenausbeute der PM-Kathode (durchgezogene Linie)

Die Quantenausbeute der Anlage stimmt also zwischen 500 nm und 700 nm innerhalb der Fehlerbreiten mit der Quantenausbeute der Kathode überein. Die Ungenauigkeiten bei der Abschwächung des Lichtes bilden den größten Beitrag zum Fehler. Im kurzwelligen Bereich liegen die gemessenen Quantenausbeuten höher als die der Kathode. In diesem Bereich beginnt die starke Änderung der Transmission mit der Wellenlänge. Das täuscht eine höhere Quantenausbeute vor, weil das Licht im langwelligen Teil des Filterfensters weniger stark abgeschwächt wird als es der Absorption im Zentrum entspricht. Die Transmission ändert sich beim

450nm-Filter innerhalb der Halbwertsbreite um den Faktor 4, beim 433nm-Filter um den Faktor 2. Deshalb liegen die Quantenausbeuten wesentlich zu hoch. Bei den langwelligeren Filtern kommt die Transmissionsänderung nicht zum Tragen, weil die Quantenausbeute zum Langwelligeren hin stark abfällt und den Effekt kompensiert.

Die Anlage ermöglicht also das Registrieren jedes Photoelektrons. Deshalb wird im gesamten Wellenlängenbereich die Quantenausbeute der Kathode zugrunde gelegt (EMI).

3.5. Kontrollmessungen

Der PM ist in geringem Maße im nahen IR-Bereich empfindlich, und die benutzten Bandfilter absorbieren die Strahlung in diesem Bereich eventuell nicht vollständig. Daher könnte eine intensive IR-Strahlung eine schwache Strahlung im sichtbaren Bereich vortäuschen. Als Kontrolle wird das Fenster eines Filters durch einen davorstehenden anderen Filter verdeckt. Wenn dann ein Photonenstrom von 10^7 Photonen/s auf den zweiten Filter trifft, erhöht das die Photonenzählrate trotzdem nicht. Die Filter haben also in dem IR-Bereich, in dem der PM noch empfindlich ist, keine zusätzlichen Durchlaßstellen.

Die Nachweisgrenze der Apparatur wird bei 543 nm bestimmt, weil die Neutralfilter bei 546 nm geeicht sind. Nach einer Abschwächung um einen Faktor $3 \cdot 10^{11}$ fällt das Licht mit einer Photonenstromdichte von $1,9 \text{ Photonen/s} \cdot \text{cm}^2$ durch eine Blende auf die PM-Kathode. In einer Meßzeit von sechs Stunden kann diese Lichtmenge auf einem Signifikanzniveau von 99,9 % nachgewiesen werden (Sa 69, Sa 70). Die entsprechende Nachweisgrenze bei den anderen Wellenlängen läßt sich mit Hilfe der Quantenausbeute berechnen und ist in Tab. 5 aufgeführt.

Die Küvetten emittieren selbst Licht. So erreicht die Strahlung von Küvetten aus normalem Quarzglas nach Belichten mit Tageslicht 12 cps. Diese Intensität ist schlecht reproduzierbar und fällt mit einer Halbwertszeit von einer

Tab. 5 Nachweisgrenze N

λ/nm	$N(\lambda) / \frac{\text{Phot.}}{\text{s cm}^2}$	λ/nm	$N(\lambda) / \frac{\text{Phot.}}{\text{s cm}^2}$
331,5	0,9	501	1,5
351	0,9	528	1,7
369	0,9	543	1,9
400	1,0	576	2,4
415	1,0	601	2,8
433	1,1	639	3,9
450	1,2	692	6,5
480	1,3	736	17

Stunde ab. Eine spezielle Fluoreszenzküvette (Fa. Hellma) zeigt nach Einbau in die Apparatur bei vollem Tageslicht eine reproduzierbare Intensität von $1,6 \pm 0,4$ cps. Allerdings muß sie dazu sorgfältig gereinigt sein. Nach einem Tag in Dunkelheit sinkt die Strahlung auf $0,7 \pm 0,3$ cps ab. Dieser Wert bleibt auch erhalten, wenn sie zwischendurch in schwaches Rotlicht kommt. Die Reinigung der Küvette für die Experimente erfolgt durch erwärmte Chromschwefelsäure und mehrmaliges Spülen in doppelt destilliertem Wasser. Bis auf einige besonders erwähnte Ausnahmen wird die Küvette nur bei schwachem Rotlicht in das Ellipsoid eingesetzt.

3.6. Ausmessen des Raumwinkels

In die Berechnung der Gesamtemission einer Probe geht der Raumwinkel ein, unter dem die Strahlung auch nach Reflexion auf die Kathode trifft. Dazu wird in der Küvette durch eine chemische Reaktion mit Luminol Licht erzeugt (Lu). Das Licht hat ein sehr breites Maximum bei 450 nm und kommt nur aus einem kleinen räumlichen Bereich in der Umgebung des Ellipsoid-Fixpunktes, weil der Rest der Küvette verklebt ist.

In die Filterhalterung (vgl. Abb. 9 und 10) wird eine Doppelblende eingeführt, so daß ein Aufbau wie in Abb. 22 vorliegt.

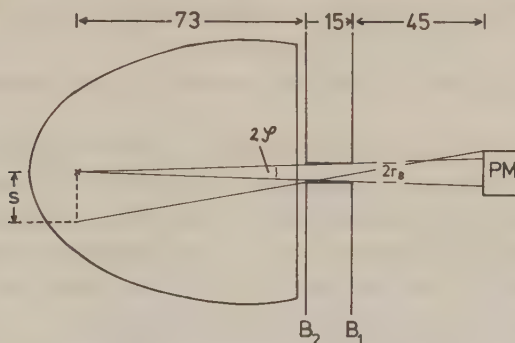


Abb. 22 Die geometrischen Verhältnisse bei der Raumwinkelbestimmung (Angaben in mm)

Die Blende B_1 legt den Raumwinkel Ω_B fest, unter dem die Strahlung aus der Küvette auf den PM trifft. Aus der Blendenöffnung und dem Abstand von der Küvette läßt sich Ω_B berechnen. Die Blende B_2 sorgt dafür, daß möglichst nur Strahlung innerhalb Ω_B auf die Kathode trifft und nicht noch zusätzlich reflektierte Strahlung. Deshalb darf die Strecke s nicht wesentlich größer als die Küvettenabmessung sein. Für die in Abb. 22 angegebenen Maße ($r_B = 1,5 \text{ mm}$) ergibt sich $\Omega_B = 9,1 \cdot 10^{-4}$ und $s = 16 \text{ mm}$.

Zur Messung des Gesamtraumwinkels Ω_g wird die Doppelblende zur Seite geschoben und das gesamte Ellipsoid freigegeben.

Das Verhältnis der Zählraten mit und ohne Blenden gibt auch das Verhältnis der entsprechenden Raumwinkel an (Ω_B/Ω_g). Nach der Messung gilt

$$\frac{\Omega_B}{\Omega_g} = \frac{1}{1500}$$

und damit für den gesamten Raumwinkel bei 450 nm

$$\Omega_g = 1,37.$$

Bei der Apparatur mit Filterwechsler hat der Raumwinkel Ω_d für die direkt auftreffende Strahlung die Größe

$$\Omega_d = 0,1.$$

Nach Gleichung (4) und Abb. 7 erhält man für den Raum-

winkel Ω_i der indirekt auftreffenden Strahlung

$$\Omega_i = 2,66.$$

Die Raumwinkel bei den anderen Wellenlängen werden nach

$$\Omega(\lambda) = \Omega_d + g(\lambda)\Omega_i$$

berechnet. Dabei sind die Reflexionskoeffizienten Abb. 7 zu entnehmen.

Bei den Messungen liegen keine idealen geometrischen Verhältnisse vor, weil die biologischen Objekte die Küvette ganz ausfüllen. Die Abweichungen verkleinern den Raumwinkel, sie gehen allerdings nur in die absolute Größe der Gesamtemission ein und nur zu einem geringen Teil in die relativen Fehler innerhalb eines Spektrums.

3.7. Auswertungsformel und Fehler

Nach Aufnahme des Spektrums wird aus der Zählrate die Gesamtzahl der aus der Probe emittierten Photonen pro Zeit- und Wellenlängeneinheit (Spektraldichte s) ermittelt. Dabei ist die Differenz zwischen Hell- und Dunkelzählrate von $n_H - n_D = -1,2 \pm 0,4$ cps bei leerem Ellipsoid und bei Zimmertemperatur zu berücksichtigen. Andererseits strahlt die Küvette selbst mit $0,7 \pm 0,3$ cps. Obwohl sich beide Effekte nahezu aufheben, müssen sie in die Auswertung bei kleinen Intensitäten einbezogen werden.

Die Spektraldichte s wird aus der Zählrate Z nach

$$s = \frac{4\pi / \Omega(\lambda)}{q(\lambda) T_f \Delta\lambda_f T_h(\lambda)} \cdot Z = F(\lambda) \cdot Z \quad (6)$$

berechnet. Dabei ist

$q(\lambda)$ die Quantenausbeute der Apparatur (Tab. 4),

T_f die maximale Transmission und

$\Delta\lambda_f$ die Bandbreite des benutzten Filters (Tab. 3),

$T_h(\lambda)$ die Transmission der Küvettenwand und

$\Omega(\lambda)$ der Raumwinkel (Tab. 6).

Tab. 6 Koeffizienten für die Auswertung

λ/nm	$T_K/\%$	$4\pi/\Omega(\lambda)$	$q(\lambda)/\%$	$F/\frac{1}{\text{nm}}$
331,5	93,1	10,9	21,7	17,9
351	93,3	10,6	22,5	16,2
369	93,4	10,4	22,8	17,3
400	93,5	9,9	21,9	5,6
415	93,5	9,7	21,0	7,6
433	93,5	9,4	19,4	4,5
450	93,7	9,2	18,1	4,3
480	93,7	8,9	15,7	5,5
501	93,8	8,7	14,1	7,3
528	93,8	8,5	12,3	24,6
543	93,8	8,4	11,0	6,0
576	93,8	8,2	8,8	7,3
601	93,8	8,1	7,4	9,2
639	93,9	8,0	5,4	35
692	93,9	7,7	3,2	53
736	93,9	7,7	1,7	137
Nebendurchlaßstellen				
360	93,3	10,6	23,0	55
365	93,3	10,4	22,8	163
380	93,4	10,3	22,5	23

Filter mit zusätzlichen Nebendurchlaßstellen bei λ_N (vgl. Tab. 3) erfordern eine Korrektur der Spektraldichten nach

$$S_{\text{Korr}}(\lambda) = S(\lambda) - \frac{F(\lambda)}{F(\lambda_N)} S(\lambda_N) \quad (7).$$

Die Spektraldichte $s(\lambda_N)$ erhält man durch Interpolation. Die Gleichung

$$\sigma_g = \sqrt{2\sigma_D^2 + \sigma_p^2} \quad (8)$$

stellt die Gesamtstreuung dar, weil sich das Signal nach Gl. (1) als

$$S = n_H - n_D = n_D + q \cdot I - n_D$$

schreiben läßt. Dabei ist σ_D die Streuung der Dunkelzählrate und σ_p die Streuung der Zählrate $q \cdot I$, die durch den Photoneinfall I entsteht. Die folgenden Meßwerte beziehen sich auf eine Meßzeit von 64/3 s. Die Streuung der DZR beträgt nach einer Messung

$$\sigma_D = 3,8 \text{ cps.}$$

Zur Bestimmung von σ_p wird wieder die lichterzeugende chemische Reaktion benutzt (Lu). In einer Sekunde laufen etwa 10^{11} lichtemittierende Reaktionen ab, so daß der statistische Fehler für die Photonenentstehung sehr klein ist. Nach einer Abschwächung um den Faktor $2 \cdot 10^6$ beträgt die Zählrate

$$S = 759,7 \pm 9,8 \text{ cps} \Rightarrow \sigma_g = 9,8 \text{ cps.}$$

Aus Gleichung (8) folgt

$$\sigma_p = 8,6 \text{ cps.}$$

Bei einer Normalverteilung hätte die Zählrate S die Streuung

$$\sigma_n = 5,9 \text{ cps}$$

gehabt, daraus folgt

$$\sigma_p = 1,4 \sigma_n.$$

Wenn dieser Faktor 1,4 nicht von der Signalzählrate S abhängt, kann der Gesamtfehler bei anderen Intensitäten berechnet werden:

$$\begin{aligned} \sigma_g &= \sqrt{2\sigma_D^2 + (1,4\sigma_n)^2} \\ \sigma_g &= \sqrt{29 + 0,09 \frac{S}{\text{cps}}} \text{ cps (9).} \end{aligned}$$

Eine Messung einer kleinen Zählrate von 60 cps bestätigt diese Formel, weil der Gesamtfehler der Streuung der DZR entspricht.

Bei größeren Meßzeiten t verkleinert sich der Fehler mit dem Faktor $\sqrt{\frac{64/3}{t/s}}$. Dieser Fehler wird nur beim Messen von Zeitabhängigkeiten eingesetzt. In allen anderen Fällen werden zur Fehlerbestimmung die Messungen mehrmals wiederholt.

4. Experimente und Meßergebnisse

4.1. Hefezellen

In Anknüpfung an die Experimente von Konev wird zunächst eine Zellkultur mit Hefezellen "torula utilis" untersucht (Ko 66).

Die Hefezellen wachsen zunächst auf einem sterilen Hefe-Stärke-Agar nach Emerson E(YpSs). Nach etwa einer Woche haben sich genügend Zellen für ein Experiment gebildet, so daß sie in einem flüssigen Nährmedium (Rider's Medium) aufgeschwemmt werden können.

Dieses Nährmedium ist eine Lösung aus mehreren Salzen, Zucker und einigen Spurenelementen (Ko 66). Die Lösung zeigt keine Absorption zwischen 700 nm und 300 nm, dann allerdings ein starkes Absorptionsmaximum bei 270 nm.

Durch mehrmaliges Zentrifugieren wird die Zellsuspension von sehr schweren und leichten Bestandteilen gereinigt und anschließend unter dem Mikroskop auf ihre Reinheit hin kontrolliert. Die Zell-Suspension ist eine weißlich-trübe Flüssigkeit. Die Sinkgeschwindigkeit der Zellen hat etwa die Größe 0,1 mm/min.

Zur Bestimmung der Zelldichte wird ein Tropfen der Suspension in eine Kapillarschicht eines speziellen Objektträgers gebracht (Neubauerkammer), und dann werden die Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt. Der Fehler einer Probe beträgt 8 %. Daher sind für eine ausreichende Genauigkeit mehrere Proben nötig.

Die maximale Teilungsgeschwindigkeit liegt bei 0,3 %/min. Das Wachstum ist nicht von Helligkeit oder Dunkelheit abhängig. Nach 4 - 5 Stunden wachsen die Zellen nicht mehr weiter, dies könnte an der Erschöpfung des Nährmediums liegen. Bei zu großen Zelldichten ($40000/\text{mm}^3$) tritt nur noch geringes oder gar kein Wachstum auf. Auch bei geringeren Zelldichten kann ohne ersichtlichen Grund das Wachstum ganz ausbleiben oder nur sehr gering sein.

Die Messung der Lichtabsorption der Zellen ergibt einen Wirkungsquerschnitt von $Q = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mm}^2$. Er ist erwar-

tungsgemäß kleiner als der geometrische Querschnitt von $A = 3 - 4 \cdot 10^{-5} \text{ mm}^2$. Wenn mehr als 90 % des von den Zellen emittierten Lichtes an die Oberfläche der Suspension gelangen soll, dann muß die Zelldichte geringer als $20000/\text{mm}^3$ sein. Dabei nehmen die Zellen etwas weniger als 1 % des Suspensionsvolumens ein.

Das Absinken der Zellen und die begrenzte Wachstumsdauer beschränken die Meßzeit auf einige Stunden.

Bei der Messung werden die Zählratendifferenzen zwischen Hell- und Dunkelzähler ermittelt, wenn die Küvette in Meßposition und im Schacht ist. Die Meßzeit in jeder Position liegt zwischen 8 min (2^9 s) und 34 min (2^{11} s).

Küvette und reines Nährmedium emittieren mit einer Intensität von $I_0 = 1,1 \pm 0,4 \text{ cps}$. Im Vergleich zur Küvette allein strahlt also das Nährmedium nur gering oder überhaupt nicht.

Die Ergebnisse der Messungen mit Hefezellen sind in Tab. 7 aufgeführt.

Tab. 7 Die Photonenemission von Hefezellen

Zelldichte $10^3/\text{mm}^3$	Zählrate cps	Signifikanz %	Biologische Aktivität
12	$18,1 \pm 1,1$	99,9	(+)
20	$12,0 \pm 0,7$	99,9	(+)
18	$3,3 \pm 0,8$	99	(+)
6,6	$2,3 \pm 0,4$	99,9	+
9,0	$1,7 \pm 0,6$	99	-
40	$1,0 \pm 0,7$	-	(-)
6,0	$0,4 \pm 0,4$	-	-
2,0	$0,3 \pm 0,4$	-	-
20	$0,1 \pm 0,5$	-	-
7,4	$0,0 \pm 0,4$	-	-

Die Intensitäten sind sehr unterschiedlich und nicht an die Zelldichte gekoppelt. Bei den geringeren Intensitäten wurde die Zelldichte vor und nach der Messung bestimmt.

Eine Kultur galt als biologisch aktiv, wenn sie die oben angegebene Zellteilungsrate zeigte.

Durch Hitze abgetötete Zellen emittierten mit herabgesetzter Intensität. Das steht im Einklang mit späteren Untersuchungen an anderen Objekten, widerspricht aber den Beobachtungen von Konev, der bei toten Zellen keine Emission feststellte (Ko 66).

Die Gesamtintensität ist so gering und so schlecht reproduzierbar, daß die Untersuchungen mit anderen biologischen Objekten fortgesetzt wurden.

4.2. Tradescantia- und Kartoffelkeime

Ein Tradescantia-Zweig von etwa 3 cm Länge bildet in dem Nährmedium Substral nach einer Woche ungefähr 1 cm lange Wurzeln. Wenn der Zweig dann samt Wurzeln aus dem Tageslicht in das Ellipsoid eingesetzt wird, zeigt er eine sehr hohe Anfangsintensität von etwa 35000 cps. Sie fällt rasch ab und erreicht nach einer Stunde ein annähernd gleichbleibendes Niveau von 60 - 70 cps. Wird die Pflanze in Dunkelheit gezogen und bei schwachem Rotlicht in das Ellipsoid gebracht, so beträgt die Anfangsaktivität etwa 1100 cps und nach einer Stunde wiederum 60 - 70 cps. In beiden Fällen sinkt die Intensität dann nur noch langsam ab und bleibt über mindestens drei Tage erhalten. Das Licht verursacht offensichtlich die hohe Anfangsaktivität, die nach etwa einer Stunde auf einen vom Licht unabhängigen Wert zurückgeht.

Reines Substral strahlt nur mit einer Intensität von 3 cps, wenn es vorher im Tageslicht war.

Die Kartoffelkeime sind etwa 1 cm lang und bleiben an einem Stück der Kartoffelknolle. Die Aktivität beträgt anfangs 300 - 400 cps und sinkt dann schnell auf 70 - 100 cps ab. Es können aber auch eine oder mehrere Phasen auftreten, in denen die Aktivität wieder ansteigt. Ein Beispiel ist in Abb. 23 dargestellt. Die Photonenaktivität ist bei mehreren Kartoffelkeimen bis zu einer Dauer von vier Tagen verfolgt worden.

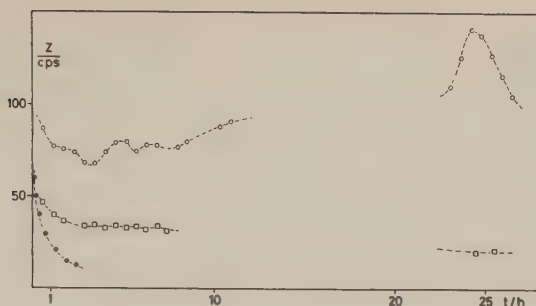


Abb. 23 Die Photonenemission von Kartoffelkeimen

- unbeeinflusster Keim
- abgetöteter Keim
- abgetöteter und zerriebener Keim

Die Meßpunkte sind wie im folgenden in der Mitte des jeweiligen Meßintervalls eingetragen.

Durch Hitze und Aceton abgetötete Keime zeigen eine geringere, langsam abnehmende Aktivität. Wird der Keim noch zusätzlich in einem Mörser zerrieben, dann sinkt die Aktivität noch wesentlich schneller ab.

4.3. Gurkenkeime

Die Gurkenkeime (GK) wachsen auf feuchter Watte in Dunkelheit. Sie haben nach 3 - 5 Tagen eine Länge von 2 - 3 cm und eine durchschnittliche Masse von 0,1 g.

Sie werden dann ohne Watte, aber mit etwas Wasser in der Küvette, in das Ellipsoid gebracht. Anfangs zeigen die GK eine Photonenemission zwischen 250 und 500 cps. Die Aktivität sinkt mit verschiedenen Geschwindigkeiten, in Stufen und auch mit zwischenzeitlichem Wiederanstieg. Zwei Beispiele sind in den Kurven I und II der Abb. 24 dargestellt. Nach einigen Stunden erreicht die Strahlung ein gleichbleibendes Niveau, das aber von Keim zu Keim sehr unterschiedlich sein kann und zwischen 50 und 200 cps liegt.

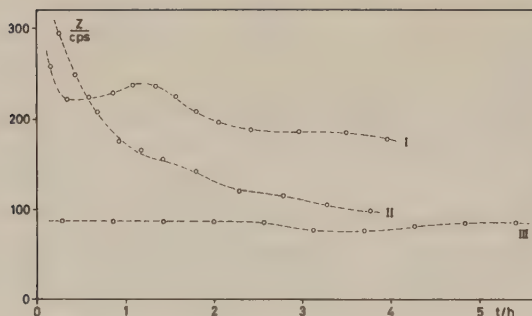


Abb. 24 Verlauf der Gesamtintensität ungestörter Gurkenkeime

I und II Keime direkt nach Einsetzen in das Ellipsoid

III Keime nach einem Tag in Dunkelheit

Auch nach einem Tag in Dunkelheit treten Schwankungen außerhalb der Fehlerbreiten auf (siehe Abb. 24, Kurve III). Die Lichtemission hält auch hier über mehrere Tage an. Ihre Intensität hängt nicht davon ab, ob der GK in Licht oder in Dunkelheit gezogen wurde. Die GK wachsen im Ellipsoid bis zu 2 cm weiter und zeigen so ihre biologische Aktivität an. Getrocknete GK strahlen noch mit einer Intensität von 20 cps.

Bei der Aufnahme des Spektrums der ultraschwachen Photonenemission von GK absorbieren die eingeschobenen Filter den größten Teil der Photonen. Deshalb treten nur sehr geringe Zählraten auf. Aus diesem Grund werden wieder die Zählratendifferenzen von Hell- und Dunkelzähler verglichen, wenn die Küvette in Meßposition bzw. im Schacht ist. Da die Gesamtzählrate mit der Zeit variiert, muß sie zur Normierung der Zählraten bei einer Wellenlänge in festen zeitlichen Abständen bestimmt werden. Der Meßfehler ergibt sich aus der Streuung der Einzelmessungen. Aus den Zählraten lassen sich entsprechend der Gleichungen (6) und (7) die Spektraldichten errechnen. Das Spektrum ungestörter GK ist in Abb. 25 zu sehen.

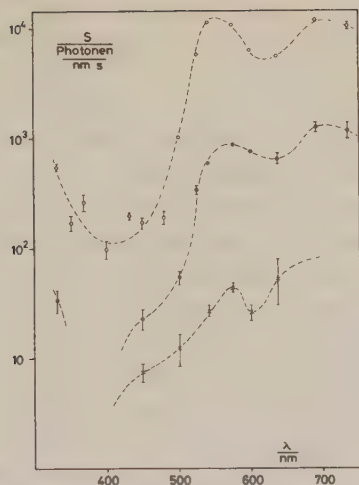


Abb. 25 Spektrum der Photonenemission von Gurkenkeimen

- × unbehandelte GK (auf 100 cps normiert)
- mit Cialit versetzte GK (auf 1000 cps normiert)
- o mit Aceton versetzte GK (auf 10000 cps normiert)

Die entsprechenden Filterbreiten sind Tab. 3 zu entnehmen.

Es tritt ein Maximum bei etwa 550 nm auf und ein Wiederanstieg im langwelligen Bereich. Bei den Wellenlängen 400 nm, 369 nm und 331,5 nm ist kein eindeutiger Nachweis der Strahlung gelungen. Aus dem Spektrum kann die Gesamt-Photonenemission von 6000 Photonen/s im sichtbaren und ultravioletten Bereich ermittelt werden ($1 \text{ cps} \hat{=} 60 \text{ Photonen/s}$). Das entspricht einer emittierten Leistung von 12000 eV/s bei einem GK.

4.4. Gurkenkeime nach Zusatz von Chemikalien

Verschiedene chemische Stoffe können die Eigenschaften der Photonenemission in unterschiedlicher Weise beeinflussen. Die verwendeten Chemikalien sind Aceton, Cialit-Lösung (2-Aethyl-Quecksilbermercaptobenzoxazol-5-carbonsaures Natrium, 1 mg/ml), gesättigte Kochsalz-Lösung und Aethanol.

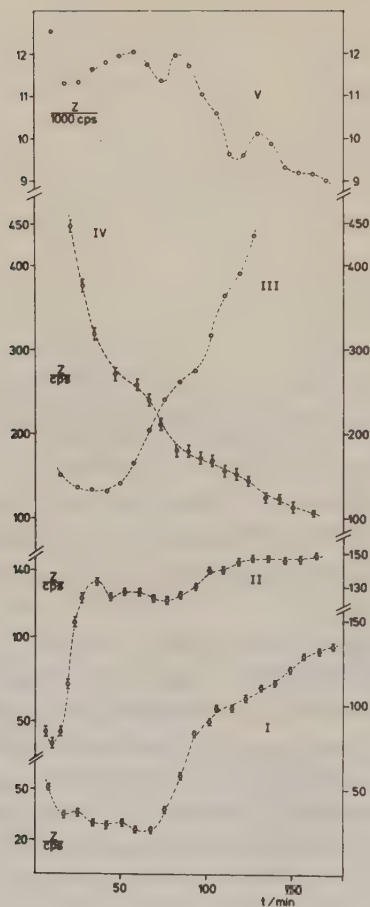


Abb. 26 Der zeitliche Verlauf der Photonenemission nach
Zugabe verschiedener Substanzen zu Gurkenkeimen

I und II	Kochsalz-Lösung
III	Cialit-Lösung
IV	Aethanol
V	Aceton

Für den Versuch wird die jeweilige Substanz bei schwachem Rotlicht auf den GK in der Küvette gegossen und sofort in Meßposition gebracht.

Bei dem zeitlichen Verlauf der Gesamtaktivität (Abb. 26) kann man zwei Typen unterscheiden.

Nach Zusatz von Aceton und Aethanol entsteht eine hohe Anfangsaktivität, die dann langsam absinkt. So erreicht die Anfangsaktivität bei Aceton 10000 cps und mehr und das Absinken verläuft langsam, stufenförmig und auch wieder mit zwischenzeitlichen Wiederanstiegen. Nach etwa 3 - 5 Stunden hat sich die Aktivität halbiert. Bei Aethanol beträgt die Intensität anfangs etwa 1000 cps. Sie fällt mit einer Halbwertszeit von etwa einer Stunde rascher ab und ist nur wenig stufenförmig. Beide Kurvenverläufe sind nicht rein exponentiell.

Ein ganz anderer Verlauf tritt bei Zugabe von Cialit- oder Kochsalz-Lösung auf. Die GK zeigen dabei zunächst ein Verhalten wie ungestörte GK. Nach einer Latenzzeit steigt dann aber die Intensität stark an. Dieser Anstieg kann sehr sprunghaft und stufenförmig erfolgen. Einige Stunden später stellt sich ein Sättigungswert ein, der bei Cialit-Lösung zwischen 1000 und 2000 cps liegt und bei Kochsalz-Lösung zwischen 200 und 600 cps. Die Latenzzeit bei der Zugabe von Kochsalz kann in Abhängigkeit von noch unbekannten Faktoren sehr unterschiedlich sein und variiert zwischen einigen Minuten und etwa einer Stunde.

Die schon mehrfach erwähnten Schwankungen können beträchtlich werden. Wie in Abb. 27 dargestellt ist, beträgt die Änderung der Aktivität bis zu einem Drittel der mittleren Gesamtaktivität.

Die Halbwertsbreite der Fluktuationen liegt etwa bei einer Stunde. Eventuell gibt es auch Fluktuationen mit einer Halbwertsbreite von ca. 10 min.

Es muß noch einmal betont werden: Die Schwankungen treten nicht immer auf und sind in dieser Größe selten. Die Abhängigkeit von biologischen Faktoren ist ungeklärt.

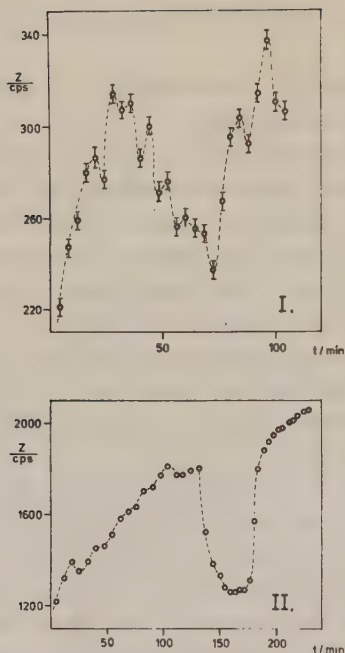


Abb. 27 Die Schwankungen der Photonenintensität von Gurkenkeimen

I Bei Zugabe von Kochsalz

II Bei Zugabe von Cialit

Die Aufnahme der Spektren erfolgt bei Aceton und Aethanol innerhalb von drei Stunden nach der Zugabe der Chemikalien und bei Cialit- und Kochsalz-Lösung dann, wenn die Gesamtintensität genügend hoch ist.

Auch bei den Spektren muß man zwei Typen unterscheiden. Die Zugabe von Aceton, Aethanol und Cialit-Lösung läßt das Spektrum, trotz einer Erhöhung der Gesamtaktivität bis zu einem Faktor um 100 (siehe Abb. 25), in seiner Struktur unverändert.

Die Zugabe von Kochsalz-Lösung dagegen ändert das Spektrum. In diesem Fall können Photonen nur im Langwelligen ab 543 nm nachgewiesen werden. Das Spektrum ist in Abb. 28 zu sehen.

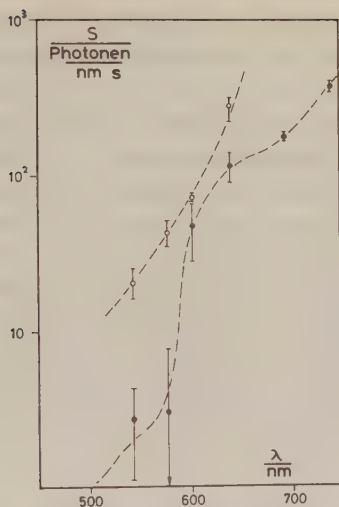


Abb. 28 Spektrum der ultraschwachen Photonenemission

- YAT-Zellen mit 4HPCP (auf 100 cps normiert)
- Gurkenkeime mit Kochsalz-Lösung (auf 300 cps normiert)

Zeitlicher Verlauf der Gesamtintensität und Spektrum sind zwei Eigenschaften der ultraschwachen Photonenemission, die unabhängig voneinander beeinflusst werden können.

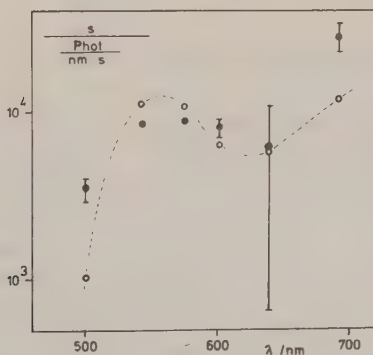


Abb. 29 Die zeitliche Änderung des Spektrums der Photonenemission bei Gurkenkeimen mit Aceton (auf 10000 cps normiert)

- direkt nach Zugabe von Aceton
- nach 20 Stunden

Kontrollversuche stellen sicher, daß einfache Reaktionen der Chemikalien oder der GK mit Wasser diese Effekte nicht verursachen.

Das Spektrum der mit Aceton versetzten GK ändert sich relativ wenig mit der Zeit. Die Strahlung bei 543 nm, die die größte Zählrate ergibt, bleibt über sieben Stunden praktisch konstant und sinkt dann erst langsam ab. Das Spektrum der GK zwanzig Stunden nach Zugabe des Acetons ist zusammen mit dem ursprünglichen Spektrum in Abb. 29 aufgetragen. Die Gesamtaktivität beträgt inzwischen nur noch 150 - 500 cps, trotzdem unterscheiden sich die beiden Spektren wenig. Die Minima und Maxima sind etwas ausgeglichen, und im langwelligen Bereich nimmt die Intensität zu.

4.5. Tumorzellen

Yoshida-Ascites-Tumor(YAT)-Zellen und Ehrlich-Ascites-Tumor(EAT)-Zellen wachsen in der Bauchhöhle von Ratten bzw. Mäusen. Sie schwimmen frei in der Gewebeflüssigkeit und werden den Tieren kurz vor dem Tod entnommen. Die Zellen von jeweils fünf Tieren bilden eine Probe.

Tab. 8 Die Photonenemission von Tumorzellen

		Konzentration mg/ml	Intensität cps	Signifikanz %
EAT-Zellen		-	$2,8 \pm 1,1$	95
"	u. CP	2	$6,2 \pm 1,2$	99,9
"	u. IP	8	$6,3 \pm 1,3$	99,9
"	u. TP	1	$3,8 \pm 1,3$	99
YAT-Zellen		-	$2,0 \pm 0,9$	95
"	u. CP	1	0	-

In Tab. 8 sind Messungen der Photonenemission der Zellen allein und nach Zugabe der Zytostatika Cyclophosphamid (CP), I-Phosphamid (IP) und Tro-Phosphamid (TP) aufgeführt.

Als Zytostatika bezeichnet man Stoffe, die das Wachstum von Tumorzellen hemmen.

Die Zellen selbst strahlen nur mit einer geringen Intensität. Sie liegt auf Grund der beschränkten Meßzeit unter der Nachweisgrenze. Die Zugabe von Zytostatika erhöht die Strahlungsintensität etwas. Lediglich bei YAT-Zellen mit CP wird die Photonenemission vermindert.

Ganz anders reagieren die Zellen nach Zugabe von 4-Hydroperoxycyclophosphamid (4HPCP), einem Analogon zum ersten Metabolisierungsprodukt von CP. Hier tritt eine starke und zeitabhängige Erhöhung der Photonenemission auf. In Abb. 30 ist die Zählrate von YAT-Zellen bei Zugabe von 4HPCP in verschiedenen Konzentrationen dargestellt.

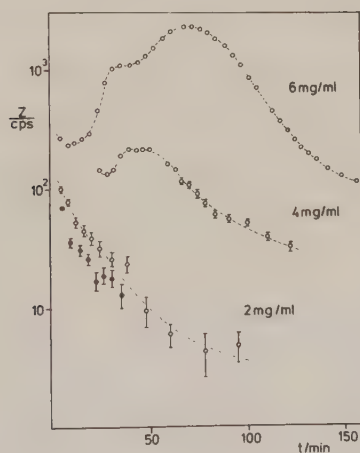


Abb. 30 Photonenemission von Yoshida-Ascites-Tumor-Zellen nach Zugabe von 4HPCP in verschiedenen Konzentrationen

● 4HPCP in wässriger Lösung (2 mg/ml)

Die Intensität zeigt wieder Schwankungen. Sie steigt bei Verdoppelung und Verdreifachung der Konzentration jeweils um fast eine Zehnerpotenz an. Die Größenordnung

und die Struktur der Kurven lassen sich reproduzieren. Auch 4HPCP in reinem Wasser strahlt Photonen ab (vgl. Abb. 30). Bei der Konzentration von 2 mg/ml macht dieser Effekt etwas über die Hälfte der Emission der YAT-Zellen aus. Die Verdoppelung und Verdreifachung der Konzentration führen zu einer annähernd proportionalen Intensitätserhöhung. Deshalb ist der Nulleffekt bei den YAT-Zellen nach Zugabe von 4 bzw. 6 mg/ml 4HPCP vernachlässigbar.

Das Spektrum der Strahlung zeigt Abb. 28. Wiederum können nur Photonen mit einer Wellenlänge von 543 nm und größer nachgewiesen werden. Aus dem Spektrum folgt die Äquivalenz $1 \text{ cps} \hat{=} 270 \text{ Photonen/s}$.

Auch EAT-Zellen emittieren nach Zugabe von 4HPCP Photonen mit ähnlichem zeitlichen Intensitätsverlauf.

5. Diskussion

5.1. Die ultraschwache Photonenemission als biologische Erscheinung

Zunächst soll geprüft werden, ob rein physikalische oder -chemische Vorgänge diese Effekte erklären können.

Schwarzer Körper

Jeder Körper der Temperatur T emittiert nach den Gesetzen über den schwarzen Körper Strahlung, auch im sichtbaren und ultravioletten Bereich. Die Emission s_b des schwarzen Körpers bei 300°K und einer Oberfläche von 10 cm^2 ist bei verschiedenen Wellenlängen in Tab. 9 angegeben. Die angenommene Fläche des schwarzen Körpers hat einen wesentlich größeren Wert als die Oberfläche der Gurkenkeime.

Tab. 9 Die gemessene Photonenemission im Vergleich zur Strahlung des schwarzen Körpers

λ/nm	$s_b / \frac{\text{Phot.}}{\text{s} \cdot \text{nm}}$	Objekt	$s_g / \frac{\text{Phot.}}{\text{s} \cdot \text{nm}}$	$\frac{s_g}{s_b}$
639	$5 \cdot 10^{-10}$	unbeh. GK	50	10^{11}
450	$2 \cdot 10^{-23}$	"	7,5	$4 \cdot 10^{23}$
331,5	$3 \cdot 10^{-39}$	GK u. Cialit	34	10^{40}

Zum Vergleich sind die gemessenen Spektraldichten s_g von unbehandelten GK bzw. mit Cialit versetzten GK eingetragen. Die Werte unterscheiden sich beträchtlich. Beim schwarzen Körper steigt die Spektraldichte mit zunehmender Wellenlänge wesentlich stärker an als bei den gemessenen GK. Deshalb nimmt das Verhältnis beider Spektraldichten mit abnehmender Wellenlänge drastisch zu. Der schwarze Körper erklärt also die auftretende Photonenemission nicht.

Natürliche Radioaktivität als mögliche Ursache

Kann nun die natürliche Radioaktivität für die Strahlung verantwortlich sein? Die mittlere Strahlenbelastung beträgt etwa 100 mrem/a. Damit absorbiert ein GK die Leistung von $L \approx 10^4$ eV/s.

Das Verhältnis der durch Photonen im sichtbaren Bereich emittierten Leistung zur absorbierten Leistung in Form von ionisierender Strahlung, d.h. die Quantenausbeute Q , ist sehr gering. Experimente mit Röntgenstrahlen (Hö 68) ergeben eine Quantenausbeute von $Q < 10^{-9}$. Damit verursacht die natürliche Radioaktivität eine Lichtemission von weniger als 10^{-5} eV/s. Da außerdem die natürliche Radioaktivität im Gegensatz zur gemessenen Strahlung zeitlich konstant bleibt, kann sie folglich nicht zur Erklärung der ultraschwachen Photonenemission herangezogen werden.

Die Bedeutung angeregter Molekülniveaus

Eine weitere einfache Erklärungsmöglichkeit sind durch Licht angeregte Moleküle mit langen Halbwertszeiten für die Lichtemission. Solche Zustände spielen zweifellos eine Rolle, weil bei sehr vielen Proben die Lichtintensität nach Versuchsbeginn zurückgeht (vgl. Abb. 23 und 24). Dennoch ist die Photonenemission nicht ausschließlich auf diesen Effekt zurückzuführen, denn die vielfach beobachteten Schwankungen und die Zunahme der Photonenaktivität lassen sich durch metastabile Zustände nicht erklären.

Ausschluß gewöhnlicher Chemilumineszenz

Unter Chemilumineszenz im gewöhnlichen Sinn soll ein Vorgang entsprechend



verstanden werden. Dabei sei A ein Molekül des Nährmediums oder der zugesetzten Substanzen und B ein isolierbares Molekül der Zelle. Die Energie für die Photonenemission kommt selbstverständlich von Nährstoffen, die

die Zelle biochemisch verarbeitet hat. In diesem erweiterten Sinn ist dann natürlich jede Lichtemission lebender Systeme Chemilumineszenz. Aber in diesem Fall spielen viele sich gegenseitig beeinflussende und rückgekoppelte biochemische Reaktionen eine Rolle, die nicht mehr dem einfachen Verlauf von Gleichung (10) entsprechen. Gegen die Chemilumineszenz im gewöhnlichen Sinne sprechen folgende Punkte:

1. Es gibt verschiedene chemische Substanzen (Aceton, Aethanol, Cialit), die nach Zugabe zu GK die Intensität beträchtlich erhöhen, das Spektrum aber ungeändert lassen (Abb. 25). Bei einer Chemilumineszenz nach Gleichung (10) hätte man bei den unterschiedlichen Chemikalien zusätzlich auftretende Peaks erwartet, im allgemeinen auch an verschiedenen Stellen. So aber scheinen die Prozesse, die in der unbeeinflussten Zelle zur Photonenemission führen, durch die Zugabe verschiedener Chemikalien zwar vermehrt, aber nicht geändert zu werden. Dadurch wird nahegelegt, daß es sich auch nach Zugabe von Chemikalien noch prinzipiell um denselben Prozeß handelt. Verschiedene Autoren hatten das zwar schon vermutet und für ihre Untersuchungen vorausgesetzt, es war aber bisher nicht durch Experimente zu belegen (siehe z.B. Po 63).

2. Bei diffusionskontrollierten Prozessen nach (10) dürften entsprechend der Gesetze der Statistik nur Schwankungen der Gesamtintensität von $< 0,5 \%$ auftreten. Tatsächlich erreichen die Schwankungen aber bis zu 30% (siehe Abb. 27). Diese bisher unbekannte Eigenschaft der Photonenemission deutet auf ein zeitlich synchrones Verhalten eines Teils der Zellen in einem GK hin, das einen zentralen Steuerungsprozeß voraussetzt. Aus der relativen Größe der Schwankungen und ihrem zeitlichen Verlauf können Erkenntnisse über die räumliche Ausdehnung des synchronen Verhaltens gewonnen werden.

3. Die Gleichung

$$J = \eta_{ce} \frac{d}{dt} [AB^*]_n \quad (11)$$

beschreibt die Abhängigkeit der Intensität I der Chemilumineszenz nach (10) von der Quantenausbeute η_{ce} und der Reaktionsrate $\frac{d}{dt} [AB^*]_n$ (Bl 69, S. 115). Wenn die Lichterzeugung nach (10) erfolgt, müssen die Zellkulturen bei gleichbleibenden externen Bedingungen - speziell der Annahme, daß die Leuchtstoffkonzentration in der Zelle konstant bleibt - eine reproduzierbare, eindeutige, Abhängigkeit zwischen Intensität und Zelldichte zeigen. Insbesondere ist bei gleicher Zelldichte die gleiche Intensität reproduzierbar zu erwarten. Den Messungen von Tab. 7 zufolge können aber bei gleichen oder annähernd gleichen Zelldichten sehr unterschiedliche Intensitäten auftreten. Die Emission der Hefezellen pro Zeiteinheit und Zelle liegt zwischen 0 und $2 \cdot 10^{-5}$ Photonen/s. Daher folgt die Lichtemission nicht den Gleichungen (11) bzw. (10). Denn bei der Herstellung des Nährmediums und der Präparation der Zellen blieben alle Parameter unverändert. Für die Intensität der Strahlung muß daher das biologische Verhalten der Zelle eine Rolle spielen.

4. Durch Integration von (11) erhält man für die Gesamtzahl der emittierten Photonen Z und die Zahl der zur Verfügung stehenden Moleküle N

$$Z = \eta_{ce} \cdot N \quad (11')$$

Aus dem Experiment von YAT-Zellen mit 4HPCP (vgl. Abb. 30) wird die Summe Z der Photonen ermittelt und aus der Konzentration die Gesamtzahl der in der Suspension vorhandenen Moleküle 4HPCP bestimmt. Es zeigt sich ein weit überproportionales Ansteigen der Photonenzahl im Vergleich zur Zahl der Moleküle. Beide Werte sind in Tab. 10 zusammen mit der aus (11') errechneten Quantenausbeute aufgeführt.

Bei diesem Experiment ändert sich also die Quantenausbeute mit der Konzentration um fast zwei Zehnerpotenzen, obwohl es Zellen aus derselben Probe sind.

Tab. 10 Die Konzentrationsabhängigkeit der Quantenausbeute bei der Zugabe von 4HPCP zu YAT-Zellen

Konzentration mg/ml	N	Z	$\frac{Z}{N} = \eta_{ee}$
2	$2 \cdot 10^{19}$	$4,3 \cdot 10^7$	$2,2 \cdot 10^{-12}$
4	$4 \cdot 10^{19}$	$2,8 \cdot 10^8$	$1,4 \cdot 10^{-11}$
6	$6 \cdot 10^{19}$	$2,3 \cdot 10^9$	$1,2 \cdot 10^{-10}$

Das kann keine Chemilumineszenz nach (10) sein. Vielmehr deutet das Experiment auf einen Regelmechanismus hin, wie er für biochemische Vorgänge in der Zelle üblich ist. Z.B. könnte das Zwischenprodukt AB^* zusätzliche Moleküle B aktivieren oder die Herstellung analoger Moleküle anregen (Rückkopplung); oder aber das Molekül A selbst initiiert eine Beschleunigung der eigenen Reaktionsfolge (Induktion, Le 75).

Die ultraschwache Photonenemission muß eine biologische Erscheinung sein, weil sie von biologischen Faktoren wie z.B. dem Zellzustand abhängt und ein Verhalten zeigt, wie es für biochemisch gesteuerte Prozesse typisch ist. Ihr muß auch eine Bedeutung für das gesamte biologische Objekt und nicht nur für einzelne Zellen zugebilligt werden, weil die großen Schwankungen auf eine Beteiligung des ganzen Gurkenkeims hinweisen.

Im folgenden sind nun einige Eigenschaften der Photonenemission und einfache Folgerungen zusammengestellt.

Die Intensität von Hefezellen liegt maximal bei 600 Photonen/s und die von GK etwa bei 6000 Photonen/s. Das präzisiert die Angaben von Tab. 1, in denen nur relative Intensitäten zu finden sind.

Um die außerordentlich geringe Intensität zu verdeutlichen, wird die Zeit T_1 , die ein Photon zum Durchqueren eines GK braucht, mit dem mittleren zeitlichen Abstand T_d zwischen zwei Photonenemissionen verglichen:

$$\frac{T_1}{T_d} = \frac{3 \cdot 10^{-11} \text{ s}}{1,7 \cdot 10^{-4} \text{ s}} \approx 10^{-7}$$

Auch bei der höchsten gemessenen Intensität erreicht das Verhältnis einen Wert von nur 10^{-5} . Die Anwesenheit eines freien Photons ist also für den Zellverband ein seltenes Ereignis. Trotzdem gibt es auch hier Unterschiede, denn im Durchschnitt strahlt eine Zelle im Gurkenkeim intensiver als eine Hefezelle:

Gurkenkeimzelle	$2 \cdot 10^{-4}$ Photonen/s,
Hefezelle	$2 \cdot 10^{-5}$ Photonen/s.

Für Änderungen der Gesamtintensität um etwa 10% benötigen die Zellen im allgemeinen eine Zeit in der Größenordnung von einer Stunde.

Das Spektrum der unbehandelten Gurkenkeime mit einem Wiederanstieg im langwelligen Bereich verfeinert und ergänzt das von Colli et al. gemessene Spektrum, das ohne Berücksichtigung des Raumwinkels und der spektralen Empfindlichkeit des PM angegeben ist (Co 55). Bei Zugabe von Cialit und Aceton können auch Photonen im UV-Bereich nachgewiesen werden.

5.2. Einfluß des biologischen Gewebes

Wenn die Strahlung in einer Quelle mit einem bestimmten Emissionsspektrum entsteht, wird sie möglicherweise auf dem Weg durch das biologische Medium in ihrer spektralen Zusammensetzung geändert. Nach den Abschätzungen entsprechend der Referenzen Th 65 und Po 77b kann das Medium das Spektrum sogar so stark verformen, daß nur angeregte Moleküle des Mediums, nicht aber die Quelle selbst beobachtet werden können.

Die von einem Punkt im Gewebe (Quelle) abgestrahlte Energie pro Zeit, Wellenlängenintervall, Raumwinkel und Fläche sei

$$i(\vec{r}_0, t, \lambda) = \frac{\partial^4 E}{\partial t \partial \lambda \partial \Omega \partial F} \quad (12)$$

Die Meßgröße "Spektraldichte" hängt mit i durch eine Mittelwertbildung nach (13) zusammen.

$$s(\bar{t}, \bar{\lambda}) = \frac{1}{T} \frac{1}{\Delta\lambda} \int_0^T dt \int_0^\infty f(\lambda) d\lambda \int_0^{4\pi} d\Omega \int_F dF \frac{\lambda}{hc} i(\bar{r}_0, t, \lambda) \quad (13)$$

Dabei ist T die Meßzeit, $f(\lambda)/\Delta\lambda$ eine Funktion, die den benutzten Filter beschreibt und $\bar{t}$ und $\bar{\lambda}$ sind die entsprechenden Mittelwerte.

Durchquert das Licht $i(\bar{r}_0, t, \lambda)$ ein optisches Medium der Dicke $d\ell$, dann ändert sich die Gesamtenergie um di durch induzierte Absorption und - Emission und durch spontane Emission nach

$$di = \frac{hc}{\lambda} [-iB_{0\lambda}\phi_\lambda n_{0\lambda} + iB_{\lambda 0}\psi_\lambda n_{\lambda 0} + A_{\lambda 0}j_\lambda n_{\lambda 0}] \frac{d\ell}{4\pi} \quad (14)$$

$B_{0\lambda}$, $B_{\lambda 0}$ und $A_{\lambda 0}$ sind dabei die Milne-Einstein-Koeffizienten für induzierte Absorption und - Emission, sowie für spontane Emission. ϕ_λ , ψ_λ und j_λ berücksichtigen für diese Prozesse die Wahrscheinlichkeiten in Abhängigkeit vom Raumwinkel und der Wellenlänge. Sie werden durch

$$\int_0^{4\pi} \int_0^\infty \phi_\lambda d\lambda d\Omega = 4\pi \quad (15)$$

normiert. Die Größen $n_{0\lambda}$ und $n_{\lambda 0}$ benennen die Dichten der Moleküle, die im betrachteten Intervall Licht absorbieren bzw. emittieren.

Zwischen den Milne-Einstein-Koeffizienten bestehen folgende Beziehungen:

$$\frac{A_{\lambda 0}}{B_{\lambda 0}} = \frac{2hc^2}{\lambda^5}$$

$$g_0 B_{0\lambda} = g_\lambda B_{\lambda 0}$$

Dabei sind g_0 und g_λ die Entartungsgrade von Grundzustand und angeregtem Zustand.

Bei gleichen raumwinkelbedingten Wahrscheinlichkeiten für induzierte Absorption und - Emission ($\phi_\lambda = \psi_\lambda$) kann die optische Weglänge $d\tau$ definiert werden zu:

$$d\tau = - \frac{hc}{\lambda} B_{0\lambda} \phi_\lambda (n_{0\lambda} - \frac{g_0}{g_\lambda} n_{\lambda 0}) \frac{d\ell}{4\pi} \quad (16)$$

Für die Änderung der Intensität di ergibt sich aus (14) die Gleichung

$$di = i d\tau - d\tau \left(\frac{2hc^2}{\lambda^5} \frac{j_\lambda}{\phi_\lambda} \left(\frac{n_{0\lambda} g_\lambda}{n_{\lambda 0} g_0} - 1 \right)^{-1} \right) \quad (17).$$

Der Ausdruck in der Klammer entsteht durch die spontane Emission und wird durch Z abgekürzt

$$Z = \frac{2hc^2}{\lambda^5} \frac{j_\lambda}{\phi_\lambda} \left(\frac{n_{0\lambda} g_\lambda}{n_{\lambda 0} g_0} - 1 \right)^{-1} \quad (18).$$

Dadurch lautet dann die Differentialgleichung

$$\frac{di}{d\tau} = i - Z \quad (19).$$

Z hängt nur von Eigenschaften und Konzentrationen der Moleküle ab. Wenn stationäre Fälle im homogenen Medium betrachtet werden, bleibt Z konstant. Die Intensität am Beobachtungsort $\vec{r} = 0$ ist dann

$$i(0, \bar{t}, \bar{\lambda}) = Z + [i(\tau, \bar{t}, \bar{\lambda}) - Z] e^{-\tau} \quad (20).$$

Die optische Weglänge τ wird nach (21) entsprechend (16) abgeschätzt. Nach den üblichen Näherungen $n_{\lambda 0} \ll n_{0\lambda}$ und $g_\lambda/g_0 = 1$ gilt

$$\tau = \frac{2\pi^2}{3} \frac{\lambda}{hc} e^2 |\vec{x}_{0\lambda}|^2 \phi_\lambda n_{0\lambda} \ell \quad (21).$$

Aus (15) folgt für ϕ_λ nach Integration über den sichtbaren Bereich und nach Anwendung des Mittelwertsatzes

$$\phi_\lambda = 2,5 \cdot 10^4 \text{ cm}^{-1}.$$

Die anderen Beispielwerte sind:

$$\lambda = 600 \text{ nm}$$

$$|\vec{x}_{0\lambda}|^2 = 10^{-6} \text{ cm}^2$$

$$n_{0\lambda} = 10^{20} \text{ cm}^{-3}$$

$$\ell = 10^{-1} \text{ cm}$$

Dann ist die optische Weglänge

$$\tau \approx 10 \Rightarrow e^{-\tau} \ll 1$$

Nach Einsetzen der Näherungen in die Gleichungen (20) und (18) ergibt sich

$$i(0, \bar{t}, \bar{\lambda}) = Z = \frac{2hc^2}{\lambda^5} \frac{i\lambda}{\phi_1} \frac{n_{20}}{n_{01}} \quad (22).$$

Im Gültigkeitsbereich der Näherungen wird das Spektrum ausschließlich durch die Konzentration und die optischen Eigenschaften der Moleküle im biologischen Gewebe bestimmt.

Diese Näherungen gelten sicherlich im kurzwelligen Bereich, weil hier die Absorption nach Messungen an biologischen Geweben auch bei geringen Schichttiefen sehr groß ist (Ur 69). Lediglich im langwelligen Bereich könnte die Absorption so gering sein, daß die Quelle selbst noch Auswirkungen auf das Spektrum hat. Der Schwerpunkt des Spektrums der Quelle selbst ist sicherlich im Vergleich mit dem gemessenen Spektrum zum Kurzwelligen hin verschoben.

Insgesamt wird also das Spektrum im wesentlichen durch die relative Zahl der angeregten Moleküle im Medium und deren molekularen Eigenschaften bestimmt (vgl. (22)). Deshalb kann die Beobachtung der ultraschwachen Photonenemission Aufschluß über die Prozesse in der Zelle geben, ohne daß dabei die Zelle zerstört werden muß, wie es bei vielen Untersuchungsmethoden notwendig ist. So läßt sich z.B. der zeitliche Ablauf von biochemischen Prozessen in der Zelle beobachten. Ebenso können Messungen mit verschiedenen Konzentrationen Aussagen über den Reaktionsmechanismus ergeben (siehe Abb. 30).

Weitere Überlegungen zur Erklärung des Spektrums im Rahmen der theoretischen Vorstellungen von Popp sind in der Referenz Po 77b angegeben.

Chemische Stoffe können die ultraschwache Photonenemission unterschiedlich beeinflussen. Einige Stoffe, wie die Zytostatika, haben keinen oder nur einen geringen Einfluß auf die Gesamtintensität, andere Stoffe können die Gesamtintensität um einen Faktor um 100 erhöhen. Die unterschiedliche

Zeitabhängigkeit der Gesamtstrahlung ist möglicherweise die Folge von verschiedenen Diffusionsvorgängen an biologischen Membranen. Danach würden die sofort wirksamen Substanzen am schnellsten durch Membranen diffundieren.

Damit wäre die Beobachtung der Photonenemission eine sichere und genaue Methode, die Diffusion eines Stoffes in das Zellinnere zu studieren (siehe Abb. 26).

Gurkenkeime überstehen fünf Minuten in einer gesättigten Kochsalz-Lösung und können dann noch weiterwachsen. Der starke Anstieg der Photonenemission entspricht eventuell der in der Einleitung (S. 2) erwähnten Degradationsstrahlung. Er wäre danach ein Anzeichen für das Auftreten von irreparablen Schäden.

Die Chemikalien, die das Spektrum ungeändert lassen, vervielfachen nach (22) die Zahl der angeregten Moleküle für alle Wellenlängen um ein und denselben Faktor, falls die Moleküleigenschaften ungeändert bleiben. Wenn diese Vermutung auch im UV-Bereich zutrifft, emittieren unbehandelte GK Strahlung auch bei 331,5 nm, weil nach Zugabe von Cialit und Aceton in diesem Wellenlängenbereich Strahlung auftritt. Konev hat bei Hefezellen sogar ein Maximum in diesem Bereich festgestellt (Ko 66).

Das Spektrum der GK nach Behandlung mit Aceton bleibt im Wesentlichen erhalten. Nach mehreren Stunden ist es etwas in den langwelligen Bereich verschoben. Unter Umständen setzt sich dieser Prozeß fort, bis am Ende der Entwicklung nur langwellige Photonen entstehen wie nach dem Zusatz von Kochsalz zu GK (vgl. Abb. 28).

Die Zugabe von 4HPCP zu YAT-Zellen dagegen beeinflusst das Spektrum vielleicht nicht, weil nach früheren Untersuchungen die Strahlung von tierischen Zellen im roten Bereich zu finden ist (Bl 68).

Die bisherigen Überlegungen stellen die Photonenemission als einen Indikator für Vorgänge in biologischen Objekten dar. Die folgenden Vorstellungen machen diese Funktion verständlich und weisen auf den engen Zusammenhang der Photonenemission mit Steuermechanismen in der Zelle im Sinne von Popp hin.

5.3. Weitere Konsequenzen der Strahlung für die Biologie

Die direkte Beziehung der ultraschwachen Photonenemission mit den biochemischen Vorgängen kann man sich so vorstellen: Die Photonenemission beweist, daß es in biologischen Objekten angeregte Moleküle gibt, oder noch größere Einheiten, die Licht emittieren (siehe auch (22)). Die mittlere Lebensdauer dieser Zustände sei T_p , für die Emissionswahrscheinlichkeit pro Zeiteinheit folgt dann $1/T_p$. Diese angeregten Moleküle können aber auch mit anderen Molekülen reagieren. Nach der Theorie von Arrhenius ist die Reaktionsgeschwindigkeit proportional zur relativen Zahl der Moleküle (N_a/N), die eine Energie über der Anregungsenergie der jeweiligen Reaktion haben.

$$\frac{dc}{dt} \sim \frac{N_a}{N}$$

Da das Strahlungsfeld in einer Zelle um den Faktor 10^{11} bis mindestens 10^{23} größer ist als in einem schwarzen Körper bei Zimmertemperatur, erhöht sich auch die relative Zahl der angeregten Moleküle um den gleichen Faktor und damit auch die Reaktionsgeschwindigkeit (vgl. Tab. 9). Durch die Strahlung werden die Reaktionen in Zellen im Vergleich zu wässrigen Lösungen beschleunigt oder praktisch erst ermöglicht. Das steht durchaus im Einklang mit experimentellen Erfahrungen: Das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten in der Zelle und in wässriger Lösung kann 10^9 betragen, wie bisherige Beobachtungen zeigen (Le 75, S. 156).

Damit ist die Reaktionswahrscheinlichkeit pro Zeiteinheit $1/T_R$ relativ groß und die mittlere Zeitdauer T_R , bis das Molekül reagiert, entsprechend klein.

Aus der gemessenen Photonenemission I_g der GK läßt sich die Reaktionsrate N_R der angeregten Moleküle berechnen.

$$N_R = \frac{T_p}{T_R} J_g \quad (23)$$

Die zeitliche Änderung der Gesamtaktivität verläuft innerhalb etwa einer Stunde. Daher können metastabile Niveaus mit einer Lebensdauer in der Größenordnung $T_p \approx 10^3$ s an-

genommen werden. Solche langlebigen Niveaus (Tripletts) gibt es, und es sind schon 10^2 s als mittlere Lebensdauer gemessen worden.

Die Reaktionsraten eines einzigen Enzyms liegen zwischen $3,6 \cdot 10^6$ /min und 10^3 /min, die mittlere Zeit zwischen zwei Reaktionen beträgt damit $T_R = 1,7 \cdot 10^{-6}$ s bis $6 \cdot 10^{-2}$ s (Le 75, S. 144). Wie oben gesagt, können die Reaktionen in der Zelle noch wesentlich schneller ablaufen.

Mit der Gesamtphotonenemission bei unbehandelten GK von $I_g = 6000$ Photonen/s (vgl. 4.3.) folgt für die Reaktionsrate in GK ein Wert zwischen

$$N_R = 3,6 \cdot 10^{12} \frac{1}{s} \text{ und } N_R = 10^8 \frac{1}{s}.$$

Für die Konzentration von Substraten in Zellen werden Größen von $5000 \mu\text{mol/l}$ bis $14 \mu\text{mol/l}$ angegeben (Le 75, S. 289); vermutlich gibt es aber viele Substrate von geringerer Konzentration. Die oben angegebenen Werte entsprechen einer Molekülzahl von $3 \cdot 10^{17}$ bzw. $8 \cdot 10^{14}$ in einem GK. Die Zeitdauer für die Verarbeitung dieser Moleküle mit der höchsten oben angegebenen Reaktionsrate beträgt dann zwischen 4 min und 24 h. Dabei ist noch zu berücksichtigen, daß in vielen Fällen nicht die gesamte Molekülzahl verarbeitet wird, sondern nur eine Konzentration in einem Regelbereich von einigen Prozent aufrecht erhalten werden muß.

Nach diesen Überlegungen können die Reaktionen, die an die Photonenemission gekoppelt sind, durchaus eine Bedeutung für die Zelle haben.

Nach (23) sind die Reaktionsrate N_R und die Photonenemission I_g proportional, falls T_p/T_R konstant bleibt. Das heißt aber:

1. Die Photonenemission I_g zeigt direkt die entsprechende Reaktionsrate an.
2. Der Prozeß, der die Photonenemission steuert, regelt auch die entsprechende Reaktionsrate in der Zelle.

Gleichung (23) erklärt auch die geringe Intensität der Strahlung: Die angeregten Moleküle reagieren, bevor sie

ihre Energie durch Lichtemission abgeben können. Aus der Zahl der im betrachteten Wellenlängenbereich anregbaren Moleküle N und der Anregungsrate W läßt sich die Photonenaktivität nach

$$J = \frac{T_R}{T_P} N_R \approx \frac{T_R}{T_P} \dot{N} = \frac{T_R}{T_P} N \cdot W \quad (24)$$

berechnen. Für T_R kann die Bedeutung erweitert werden, in dem Sinn, daß sie nun die mittlere Zeit bis zum Eintreten irgendeines strahlungslosen Prozesses sein soll, wie chemische Reaktionen, strahlungslose Übergänge und Photonenemission mit anschließender Resonanzabsorption.

Diese zusätzlich einbezogenen Prozesse verringern die Lebensdauer T_R .

Wenn bei bestimmten Zeiten oder Wellenlängen keine oder nur geringe Strahlung auftritt, kann das nach (24) verschiedene Ursachen haben:

1. niedrige Zahl von anregbaren Molekülen,
2. niedrige Anregungsrate,
3. kurze Zeitdauer bis zu einer chemischen Reaktion und
4. quasistabile angeregte Zustände.

Das rasche Absinken der Gesamtintensität innerhalb weniger Minuten wird eventuell durch das Eröffnen eines neuen Reaktionsweges erklärt. Dadurch nimmt T_R ab und die Intensität pegelt sich auf einen niedrigeren Stand ein. Entsprechend steigt die Intensität an, wenn eine Reaktionsmöglichkeit verschwindet.

Damit ist gezeigt, daß nach quantitativen Betrachtungen die ultraschwache Photonenemission auch für biochemische Prozesse in der Zelle von primärer Bedeutung sein kann.

6. Zusammenfassung der Ergebnisse und Folgerungen

1. Die Existenz einer spontanen ultraschwachen Photonenemission aus biologischen Objekten ist auf einem Signifikanzniveau $\gg 99,9\%$ bestätigt worden.
2. Die Intensität der Strahlung aus einem Gurkenkeim liegt bei 6000 Photonen/s. Andere Pflanzenkeime strahlen in derselben Größenordnung.
3. Das Spektrum zeigt ein Maximum bei 550 nm und einen Wiederanstieg im langwelligen Bereich.
4. Es gibt Chemikalien, die die Gesamtemission der Keime um bis zu zwei Zehnerpotenzen erhöhen, das Spektrum aber ungeändert lassen. Diese Chemikalien scheinen also die natürlich ablaufenden Prozesse zu verstärken, ohne daß sie geändert werden. Bei diesen Proben lassen sich auch Photonen im UV-Bereich nachweisen.
5. Sowohl bei unbehandelten Keimen als auch nach Zugabe von Chemikalien treten Intensitätsschwankungen auf (bis zu 30 % der Gesamtaktivität bei Chemikalien), die die statistischen Schwankungen weit übersteigen. Damit wird ein zeitlich synchrones Verhalten eines Teils der Zellen in einem Keim angedeutet.
6. Die Zugabe von 4HPCP in verschiedenen Konzentrationen zu Tumorzellen steigert die Photonenemission weit überproportional. Das kann nur durch einen biochemischen Regelmechanismus erklärt werden.
7. Nach den Punkten 4 - 6 stellt sich die Photonenemission als ein Vorgang dar, der mit biologischen Prozessen in der Zelle, und vermutlich sogar in größeren Bereichen des biologischen Objekts, verknüpft ist. Die Photonenemission kann daher zur Beobachtung von Reaktionsabläufen und Diffusionsvorgängen in der Zelle dienen, ohne daß dabei die Zelle wesentlich gestört oder gar zerstört wird.
8. Darüber hinaus gibt es experimentelle Anzeichen und Überlegungen, daß die Steuerungsprozesse und Kommunikationsphänomene in der Zelle eng mit der Photonenemission verknüpft sind.

Referenzen

- Ag 65a A. Sh. Agaverdiyev and B. N. Tarusov
Biophysics 10, 387 (1965)
- Ag 65b A. Sh. Agaverdiyev, Ya. Ye. Doskoch and B. N. Tarusov
Biophysics 10, 920 (1965)
- Ag 73 A. Sh. Agaverdiyev and B. N. Tarusov
Biophysics 18, 97 (1973)
- Al 68 R. R. Alfano and N. Ockman
J. Opt. Soc. Am. 58, 90 (1968)
- Ar 67 V. V. Artem'ev, A. S. Goldobin and L. N. Guskov
Biophysics 12, 1278 (1967)
- Au 35 R. Audubert, R. Lévy
C. R. hebdomadaire des Séances Acad. Sci. 200, 1634 (1935)
- Au 38 R. Audubert
Angew. Chem. 51, 152 (1938)
- Ba 69 G. M. Barenboim, A. N. Domanskii, K. K. Turoverov
Luminescence of Biopolymers and Cells
Plenum Press, New York, London 1969
- Be 57 O. Becher
Biol. Zentralbl. 76, 141 (1957)
- Bi 73 H. Bielka
Molekulare Biologie der Zelle
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1973
- Bl 68 V. V. Blokha et al.
Biophysics 13, 1084 (1968)
- Bu 60 W. S. Bullough
Exp. Cell Res. 21, 394 (1960)
- Fu 61 W. S. Bullough, E. B. Laurence
Proc. Roy. Soc., London (B) 154, 540 (1961)
- Ch 30 J. Chariton, G. Frank, N. Kannegießer
Naturw. H. 19, 411 (1930)
- Co 11 W. W. Coblentz
Phys. ZS 12, 917 (1911)
- Co 54a L. Colli and U. Facchini
Nuovo Cimento 12, 150 (1954)
- Co 54b L. Colli, U. Facchini and U. Rossi
Nuovo Cimento 11, 255 (1954)

- Co 55 L. Colli et al.
Experimentia 11, 479 (1955)
- Co 71 P. B. Coates
J. Phys. E 4, 201 (1971)
- De Konstruktion und Bau der Zähler von P. Dechant
FB Physikalische Chemie, Universität Marburg
- Do 69 Ya. Ye. Doskoch, A. P. Yakovlev and B. N. Tarusov
Biophysics 14, 596 (1969)
- Eb 67 E. H. Eberhardt
Appl. Opt. 6, 251 (1967)
- EMI Photomultiplier Tubes, EMI Electronics Ltd, 1970
- Er 75 M. Erbe, Dissertation, Marburg 1977
- Fo 69 R. Foord et al.
Appl. Opt. 8, 1975 (1969)
- Fr 31 G. Frank und S. Rodinow
Naturw. II, 659 (1931)
- Ga 50 A. W. Galston
Science 111, 619 (1950)
- Ga 65 M. Gadsden
Appl. Opt. 4, 1446 (1965)
- Gr 37 L. Grebe, A. Krost und L. Peukert
Strahlenth. 60, 575 (1937)
- Gu 59 A. G. Gurwitsch und L. D. Gurwitsch
Die mitogenetische Strahlung
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1959
- Ha 63 R. Haase
Thermodynamik der irreversiblen Prozesse
Dietrich Steinkopf Verlag, Darmstadt 1963
- Ho 37 A. Hollander, W.D. Clauss
Bull. nat. Res. Conc. Nr. 100 (1937)
- Hö 65 M. Höfert
Biophysik 2, 166 (1965)
- Hö 68 M. Höfert
Strahlenth. 135, 103 (1968)
- Jo 71 M. Jonas and Y. Alon
Appl. Opt. 10, 2436 (1971)
- Ka 73a V. Kazhacheyev, S. Shurin, L. Mikhailova
Naturw. Rundsch. 26, 444 (1973)

- Ka 73b V. Kazhacheyev, S. Shurin, L. Mikhailova
New Scientist 57, 172 (1973)
- Ke 69 A. Kelner
The Biological Effects of Ultraviolet Radiation
Ed. F. Urbach
Pergamon Press, New York 1969
- Ke 72 R. J. Keyes and R. H. Kingston
Physics Today 25, 48 (1972)
- Ko 65 S. V. Konev and T. I. Lyskova
Biophysics 8, 1102 (1965)
- Ko 66 S. V. Konev, T. I. Lyskova and G. D. Nisenbaum
Biophysics 11, 410 (1966)
- Kr 34 K. H. Kreuchen und J. B. Bateman
Protoplasma 22, 243 (1934)
- Le 35 R. Lévy und R. Audubert
C. R. hebdomadaire des Séances Acad. Sci. 201, 236 (1935)
- Le 75 A. L. Lehninger
Biochemie
Verlag Chemie, 1975
- Lo 74 W. Loos
Naturw. Rundsch. 27, 108 (1974)
- Lu Artikel: Kaltes Licht des Luminols
Chemie in unserer Zeit 1975 Nr. 6 S. 192
- Ma 58 R. Mason
Brit. J. Canc. 12, 469 (1958)
- Ma 69 T. G. Mamedov, G. A. Popov and V. V. Konev
Biophysics 14, 1102 (1969)
- Mo 68 G. A. Morton
Appl. Opt. 7, 1 (1968)
- Na 68 J.K. Nakamura and S. E. Schwarz
Appl. Opt. 7, 1073 (1968)
- Od 37 Sh. Odani
Japan. J. Obstetrics Gynecol. 20, 117 (1937)
- Ol 68 C. J. Oliver and E. R. Pike
Brit. J. Appl. Phys. Ser. 2 Vol. 1, 1459 (1968)
- Po 63 G. A. Popov and B. N. Tarusov
Biophysics 8, 372 (1963)
- Po 72a F. A. Popp
Z. Naturf. 27b, 731 (1972)

- Po 72b F. A. Popp
Z. Naturf. 27b, 850 (1972)
- Po 72c F. A. Popp
Strahlenth. 144, 208 (1972)
- Po 74 F. A. Popp
Archiv f. Geschwulstf. 44, 295 (1974)
- Po 75 F. A. Popp
Molecular Base of Malignancy
Ed. E. Deutsch et al., Thieme, Stuttgart 1975
- Po 76 F. A. Popp
Biophotonen
Verlag Dr. Ewald Fischer, Heidelberg 1976
- Po 77a F. A. Popp
Archiv f. Geschwulstf., im Druck
- Po 77b F. A. Popp, B. Ruth
Drug Research, im Druck
- Po Persönliche Mitteilung, F. A. Popp
- Pu 55 A. Pullman and B. Pullman
Advances Cancer Res. 3, 117 (1955)
- Ra 31 B. Rajewsky
in "Zehn Jahre Forschung im medizinisch-physika-
lischen Grenzgebiet"
Hrsg.: F. Dessauer, G. Thieme Verlag, Leipzig 1931
- Ro 63 J. P. Rodman and H. J. Smith
Appl. Opt. 2, 181 (1963)
- Ro 70 J. Rolfe and S. E. Moore
Appl. Opt. 9, 63 (1970)
- Ru 74 H. Rubin
in "Cell Communication"
Ed.: R. P. Cox, J. Wiley & Sons, New York 1974
- Ru 76 B. Ruth, F. A. Popp
Z. Naturf. 31c, 741 (1976)
- Sa 69 L. Sachs
Statistische Auswertemethoden
Springer Verlag, Berlin 1969
- Sa 70 L. Sachs
Statistische Methoden
Springer Verlag, Berlin 1970

- Se 32 F. Seyfert
Jb. wiss. Bot. 76, 747 (1932)
- Sh 72 L. S. Shlyakhtina and A. A. Gurvich
Biophysics 17, 1146 (1972)
- Sü 70 R. Süß, V. Kinzel, J. D. Scribner
Krebs
Springer Verlag, Berlin 1970
- Sz 41 A. Szent-Györgyi
Science 93, 609 (1941)
- Sch 30 H. Schreiber und W. Friedrich
Biochem. Z. 227, 386 (1930)
- Sch 39 H. Schreiber
Fundamenta Radiologica 4, 132 (1939)
- Sch 75 J. Schröter
Physik in unserer Zeit 1975, Nr. 6 S. 172
- St 32 W. Stempell
Die unsichtbare Strahlung der Lebewesen
Verlag Fischer , Jena 1932
- St 35 B. Sturm
Z. Physik 94, 85 (1935)
- St 62 J. Stauff and G. Bümmler
Z. Phys. Chem. N. F. 34, 67 (1962)
- St 64 J. Stauff and G. Reske
Naturw. 51 (2), 39 (1964)
- St 66 J. Stauff and J. Ostrowski
Z. Naturf. 22b, 734 (1966)
- Th 65 R. N. Thomas
Some Aspects of Non-equilibrium Thermodynamics
in the Presence of a Radiation Field
University of Colorado Press 1965
- Ur 69 F. Urbach
The Biological Effects of Ultraviolet Radiation
Ed.: F. Urbach
Pergamon Press, New York 1969
- Va 68 Valvo, Technische Informationen für die Industrie
Abschirmungen für Photovervielfacher, April 1968
- Va 74 Valvo, Photomultipliers
Valvo GmbH, Hamburg

- Ve 63 V. A. Veselovskii, Ye. N. Sekamova and B.N. Tarusov
Biophysics 8, 147 (1963)
- Vl 64 Yu. A. Vladimirov and O. E. L'vova
Biophysics 9, 548 (1964)
- We Konstruktion der Kühlkammer nach einem von
Prof. Weiser (FB Physik) dankenswerterweise zur
Verfügung gestellten Bauplan.
- Ya 69 I.O. Yafarova and V. A. Veselovskii
Biophysics 14, 390 (1969)
- Yo 69 A. T. Young
Appl. Opt. 8, 2431 (1969)
- Za 72 M. R. Zatzick
Electro - Optical System Disign
June 1972 p 20-23, 26-27
- Zh 73 A. J. Zhuravlev, O. P. Tsvylev and S. M. Zubkova
Biophysics 18, 1101 (1973)
- Zu 65 R. Zurmühl
Praktische Mathematik für Ingenieure und Physiker
Springer Verlag, Berlin 1965

Mein besonderer Dank gilt Herrn Doz. Dr. F. A. Popp für die interessante Themenstellung und die ausführlichen Diskussionen, insbesondere bei der Deutung der experimentellen Ergebnisse.

Ebenso danke ich den Herren Prof. Schaumlöffel und Dr. Rüther für die Unterstützung beim biologischen Teil der Experimente, wie auch den Angestellten des Radiologiezentrums, Theoretische und Experimentelle Radiologie, für ihre Hilfe.

Der experimentelle Teil der Arbeit wurde im FB Physikalische Chemie durchgeführt. Für die Hilfe, die Zusammenarbeit und die Möglichkeit für die Messungen danke ich den Herren Dr. Schreiber, Dr. Dechant, Petri, Schrauf, Schüssler und Prof. Försterling.

Die Arbeitsgruppen Kernphysik und Festkörperphysik vom FB Physik stellten mir dankenswerterweise einige Geräte für die Messungen zur Verfügung.

Bernhard Ruth

Geboren am 13.4. 1947 in Winterscheid

- 1953 - 1957 Besuch der Volksschulen Winterscheid und
Schönbach
- 1957 - 1959 Mittelschule Kirchhain
- 1959 - 1966 Aufbaugymnasium Kirchhain
- 1968 - 1973 Physikstudium an der Universität Marburg
- 1972 - 1974 Mitglied der Arbeitsgruppe Kernreaktionen,
FB Physik der Universität Marburg
- Ende 1973 Abschluß der Diplomarbeit bei Prof.Dr.R.Stock:
"Die experimentelle Methode zur Messung der
Asymmetrie von Winkelverteilungen der Reaktion
 ${}^3\text{H}({}^3\text{He}, {}^2\text{H}){}^4\text{He}$ "
- Ab 1974 Wissenschaftlicher Mitarbeiter von
Doz. Dr. F.A. Popp im Radiologiezentrum,
Theoretische und Experimentelle Radiologie,
der Universität Marburg

